

**IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE  
CEPAS TIPO *Lactobacillus* EN UN PROCESO FERMENTATIVO DE PULPA DE  
CAFÉ**



**GEIDY KATERINE HERNÁNDEZ BALLESTEROS  
LILIANA MARCELA LÓPEZ RÍOS**

**UNIVERSIDAD LIBRE DE COLOMBIA  
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INGENIERIA AMBIENTAL  
SOCORRO  
COLOMBIA, 2020**

IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE  
CEPAS TIPO *Lactobacillus* EN UN PROCESO FERMENTATIVO DE PULPA DE  
CAFÉ

Geidy Katherine Hernández Ballesteros  
Liliana Marcela López Ríos

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Ambiental

**Directora:** Martha Lucía Díaz Rodríguez  
Bacterióloga y Laboratorista, Msc. Microbiología  
**Codirectora:** María del Pilar Guauque Torres  
Química, Dra. Ciencia y tecnología de los materiales

UNIVERSIDAD LIBRE DE COLOMBIA  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias  
Ingeniería Ambiental  
Socorro  
2020

## **DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD**

“La presente propuesta de trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental de la Universidad Libre no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de calificación alguna, ni de título, o grado diferente o adicional al actual. La propuesta de proyecto de grado es resultado de las investigaciones del autor(es), excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”

---

Geidy Katherine Hernández Ballesteros

---

Liliana Marcela López Ríos

## DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios quien nos dio no solo la oportunidad para estudiar sino también fue la fuente de inspiración y fortaleza que nos ha acompañado desde siempre. Gracias Señor por siempre estar en nuestro camino, por cuidarnos, por guiarnos y por ser nuestra fuente apoyo en los buenos y malos momentos, por ayudarnos en cada etapa y ser siempre nuestro pilar más importante para alcanzar esta meta.

A nuestros padres Orlando, Sandra, Gloria y Jesús por creer en nuestros sueños, apoyándonos desde siempre con su amor y paciencia, siendo el motor que nos inspira a ser mejores personas cada día y mostrándonos con su ejemplo a lograr lo que nos propongamos.

A nuestras asesoras Martha y Pilar que nos ayudaron en todo el proceso de investigación y sin las cuales no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.

A la familia caro por siempre mostrarme su apoyo y su amor sin importar cosas triviales como los lazos de sangre, a quienes consideró parte de mi familia y quienes son muy importantes en mi vida. Con su ejemplo e inspiración me han mostrado que si se sueña algo con trabajo y esfuerzo se puede cumplir.

A nuestras familias, por estar con nosotras dándonos su apoyo y amor.

A Eduar García que te encuentras en el regazo del Señor y nos permitiste conocer lo que es tener una amistad sincera y pura, por cuidarnos desde el cielo y ayudarnos en los momentos de oscuridad en nuestra vida. Por darnos fortaleza en los buenos y malos momentos, por estar siempre para nosotras, por ser ese hermano mayor que no tuvimos, Gracias por todo lo momentos compartimos juntos, por haber sido ese amigo fiel e incondicional, lleno de cualidades increíbles que nos enseñó lo bonito que es vivir y más si es rodeado de amigos que se convirtieron en familia, siempre te llevaremos en nuestro corazón.

A mis hermanas Paula, Andrea y Sara por siempre estar para mí, por apoyarme en cada situación ya sea buena o mala además de ser personas especiales e importantes en este proceso como lo fue nuestra carrera universitaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Libre seccional Socorro, a nuestras asesoras Martha Díaz y María del Pilar Guauque, por su paciencia y apoyo incondicional, su colaboración; por sus aportes y recomendaciones profesionales y personales que nos permitieron no solo culminar nuestra carrera profesional sino también adquirir nuevos conocimientos que nos ayudaran a crecer como ingenieras.

A nuestros padres quienes con su apoyo nos permitieron realizar una carrera universitaria acompañándonos en todo el proceso. Con su amor incondicional nos ayudaron a estar tranquilas en los momentos de incertidumbre y angustia dándonos valentía para culminar nuestros estudios.

A nuestras amigas y compañeras Erika, Jenny, Yenifer y Natalia gracias a las cuales pudimos realizar una colaboración conjunta y sin ellas no se hubiera podido realizar esta investigación.

Y por su puesto a Dios que nos inspiró y nos puso en el camino tantas personas maravillosas para que nos colaboraran de una u otra manera en el desarrollo de nuestra carrera.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	11
INTRODUCCION .....	12
ANTECEDENTES .....	14
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	16
2. JUSTIFICACIÓN .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
4. MARCO TEÓRICO .....	20
4.1. IMPACTO AMBIENTAL.....	20
4.1.1. Deforestación.....	20
4.1.2. Pérdida de biodiversidad .....	20
4.1.3. Contaminación agroquímica .....	21
4.1.4. Erosión del suelo .....	21
4.1.5. Afectación al suelo.....	21
4.1.6. Uso del agua.....	21
4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LA PULPA DE CAFÉ ..	23
4.2.1. Composición de la pulpa de café.....	23
4.2.2. Estructura de la pulpa de café .....	24
4.3. MICROORGANISMOS.....	25
4.3.1. Bacterias gram positivas.....	25
4.3.2. Bacterias anaerobias .....	26
4.3.3. Fermentación anaerobia.....	26
4.4. IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA .....	27
4.5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE ENSILAJE.....	28
5. METODOLOGÍA .....	31
5.1. VARIABLES .....	31
5.2. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	32
5.2.1. Equipos.....	32

5.2.2. Reactivos.....	32
5.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS .....	33
5.4. POBLACIÓN Y MUESTRA .....	33
5.5. ENSAYOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	33
5.5.1. Obtención de la primera muestra y ensilaje primer ensayo: .....	33
5.5.2. Modificaciones de los medios de cultivo.....	34
5.5.3. Siembra de colonias aisladas del medio de cultivo modificado .....	34
5.5.4. Prueba de catalasa y oxidasa.....	34
5.5.4.1. Prueba de catalasa .....	35
5.5.4.2. Prueba de la oxidasa. ....	35
5.6. FERMENTACIÓN EN PRESENCIA DE PULPA DE CAFÉ: PRIMER DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	35
5.6.1. Preparación del inóculo .....	35
5.6.2. Preparación del sustrato .....	36
5.6.3. Preparación de la fermentación: primer diseño .....	36
5.7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN: SEGUNDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	37
5.7.1. Preparación ensilaje del segundo ensayo .....	37
5.7.2. Preparación de colonias del ensilaje segundo ensayo .....	38
5.7.3. Preparación de la cepa para el segundo ensayo.....	38
5.7.4. Tipo de bacteria y purificación de la cepa.....	39
5.7.5. Preparación del segundo diseño de experimentos .....	39
5.7.6. Pretratamiento de la pulpa.....	39
5.7.6.1. Pulpa de café con hidrólisis ácida .....	39
5.7.6.2. Pulpa de café con deshidratación parcial.....	39
5.7.6.3. Pulpa de café sin tratamiento.....	39
5.7.7. Preparación del inóculo con caldo MRS .....	40
5.7.8. Preparación del inóculo al 2.50% .....	41
5.7.9. Preparación de la optimización de las condiciones segundo ensayo .....	42
5.7.10. Diluciones y conteo en placa.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1. ENSAYOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	45

6.1.1. Obtención de la primera muestra y ensilaje del primer ensayo .....	45
6.1.2. Siembra de colonias aisladas del medio de cultivo modificado .....	46
6.1.3. Prueba de catalasa y oxidasa.....	46
6.2. FERMENTACIÓN EN PRESENCIA DE PULPA DE CAFÉ: PRIMER DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	47
6.2.1. Histograma del primer diseño de experimentos .....	47
6.2.2. Análisis y discusión de resultados primer diseño de experimentos ...	49
6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN: SEGUNDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	56
6.3.1. Preparación de colonias del ensilaje segundo ensayo .....	56
6.3.2. Preparación de la cepa para el segundo ensayo.....	57
6.3.3. Tipo de bacteria y purificación de la cepa.....	63
6.3.4. Resultados segundo ensayo de fermentación .....	65
CONCLUSIONES.....	74
RECOMENDACIONES .....	75
REFERENCIAS.....	76



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores nutricionales de la pulpa de café .....	23
Tabla 2. Composición química de la pulpa de café .....	24
Tabla 3. Variables del primer ensayo .....	31
Tabla 4. Variables del segundo ensayo .....	31
Tabla 5. Cantidad de inóculo agregado a cada muestra .....	36
Tabla 6. Nombres de las muestras del segundo ensayo.....	42
Tabla 7. Distribución de frecuencias .....	48
Tabla 8. Promedio y desviación estándar de las condiciones del primer ensayo ..	49
Tabla 9. Resultados de las tinciones de Gram de las cepas 1-9.....	57
Tabla 10. Resultados en las siembras de Agar MRS con Azul de Metileno. ....	60
Tabla 11. Tinción de gram de las mejores cepas .....	63
Tabla 12. Resultados estadísticos de la pulpa sin tratamiento.....	67
Tabla 13. Resultados estadísticos de la pulpa con hidrólisis ácida .....	69
Tabla 14. Resultados estadísticos pulpa con deshidratación parcial .....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto de pulpa de café .....	25
Figura 2. Fermentación láctica homofermentativa.....	27
Figura 3. Fermentación láctica heterofermentativa .....	27
Figura 4. Proceso de producción de ácido láctico .....	29
Figura 5. Proceso de ensilaje del primer ensayo (a, b y c).....	34
Figura 6. Inóculo preparado .....	35
Figura 7. Preparación de Sustrato.....	36
Figura 8. Incubación de Muestras .....	37
Figura 9. Preparación ensilaje del segundo ensayo (a, b y c) .....	37
Figura 10. Preparación de colonias del segundo ensayo .....	38
Figura 11. Estrategias de la Pulpa de Café .....	40
Figura 12. Preparación de Inóculo con Caldo MRS .....	40
Figura 13. Muestras con Pulpa de Café .....	43
Figura 14. Preparación de diluciones .....	44
Figura 15. Dilución de muestras para conteo en placa (a y b) .....	44
Figura 16. Diluciones sembradas con muestra .....	45
Figura 17. Muestras con Agar Sangre y MacConkey .....	45
Figura 18. Cepa de Bacilos Gram Positivos .....	46
Figura 19. Histograma del primer ensayo .....	48
Figura 20. Cajas de bigotes a las 24 h del primer ensayo (a, b y c) .....	50
Figura 21. Cajas de bigotes a las 60 h primer diseño .....	51
Figura 22. Cajas de bigotes a las 96 h primer diseño .....	52
Figura 23. Presencia de <i>Lactobacillus</i> en diferentes tiempos de fermentación .....	54
Figura 24. Bacterias tipo <i>Lactobacillus</i> (a, b, c y d) .....	57
Figura 25 Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en la pulpa sin tratamiento.....	66
Figura 26. Caja de bigotes pulpa sin tratamiento cepa 1 y 9.....	68
Figura 27. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en la pulpa con hidrólisis ácida.....	68
Figura 28. Caja de bigotes pulpa con hidrólisis ácida cepa 1 y 9.....	70
Figura 29. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en la pulpa con deshidratación parcial ..	71
Figura 30. Caja de bigotes pulpa con deshidratación parcial cepa 1 y 9.....	73

## RESUMEN

El objetivo general de esta investigación fue identificar las condiciones óptimas de crecimiento para cepas tipo *Lactobacillus* en un proceso de fermentación de la pulpa de café. Se realizaron ensayos de aislamiento e identificación de los microorganismos naturales de la pulpa de café haciendo siembras y selección de colonias aisladas de las que se obtuvieron cepas tipo *Lactobacillus* Gram positivas. Para la fermentación se realizó un primer ensayo en presencia de pulpa de café (10%, 15% y 20%) con preparaciones de inóculo al 1%, 2.50% y 4%, y tiempos de fermentación de 24 h, 60 h y 96 h para determinar las condiciones óptimas para el crecimiento del *Lactobacillus*, las cuales fueron 15% de pulpa, 2.50% de inóculo y 60 h de fermentación con una producción de ácido láctico de 0.15 mg/L. Para el segundo ensayo de fermentación se utilizaron las condiciones óptimas obtenidas en el primer ensayo, pero esta vez se implementaron tres estrategias las cuales fueron pulpa sin tratamiento (PN), pulpa con deshidratación parcial (PS) y pulpa con hidrólisis ácida (PT) de las que se analizó que el mejor crecimiento de bacterias tipo *Lactobacillus* fue para la pulpa con deshidratación parcial de la cepa 9 la cual presentó el máximo de bacterias correspondientes a  $16 \times 10^9$  UFC/mL con una producción promedio de ácido láctico de 0.19 mg/L.

## INTRODUCCION

Colombia es reconocido como el productor y exportador líder en el segmento de café suaves con una producción promedio de 14.80 millones de sacos de 60 kg en el año 2019, siendo el tercer productor de café a nivel mundial (Federación Nacional de Cafeteros [FNC], 2019). El área sembrada de café en este mismo año fue de 815.192 hectáreas correspondientes al 18.80% del total del área sembrada en el país y el área cosechada de café para el 2019 fue de 584.122 hectáreas equivalentes al 20.40% del área cosechada en Colombia. En Santander el área total sembrada y cosechada de café fue de 45.444 hectáreas y 39.643 hectáreas correspondientemente (Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE], 2020).

La caficultura representa una actividad de gran importancia en el municipio de El Socorro, Santander. De las 12.200 hectáreas con las que cuenta, 3.280 hectáreas están cultivadas en café es decir el 27% de las hectáreas se dedican a la caficultura y es que las condiciones agroecológicas permiten rendimientos por hectárea en promedio de 17 cargas de café pergamino seco (Alcaldía municipal de Socorro, Santander, 2016-2019).

El beneficio húmedo del café es un proceso usado para transformar el fruto maduro del café a café pergamino seco, puesto que una vez cosechado este se convierte en un material perecedero. Existen varios tipos de beneficio entre ellos está el beneficio convencional del café en el cual se usa agua en las etapas de despulpado, lavado y transporte (del fruto, del café despulpado y del café lavado) en este el consumo de agua es cercano a los 40 litros de agua por cada kilogramo de café pergamino seco en este tipo de beneficio no se realiza un manejo a los subproductos obtenidos que son la pulpa y el mucílago (Valencia et al., 2015).

En el beneficio ecológico del café y aprovechamiento de los subproductos (BELCOSUB) se despulpa sin agua y se realiza el transporte no hidráulico de la pulpa hasta una fosa techada, en este mismo sitio se hace la transformación de la pulpa que puede aprovecharse para la producción de abono orgánico, hongos o bioenergía. En cuanto al mucílago se realiza su eliminación de forma natural o mecánica con la ayuda de desmucilaginosos, lavadores mecánicos o tanques de fermentación de esta manera se evita el 74% de la contaminación del agua por causa de los subproductos del proceso del beneficio realizando un control mediante el aprovechamiento de los mismos (Valencia et al., 2015).

Cabe mencionar que la mala disposición de la pulpa de café en sitios no adecuados genera un alto impacto ambiental que preocupa a la comunidad, es por eso que se deben tomar medidas para mitigarlo y así aprovecharlo. Una de estas formas es usarlo como biomasa para el crecimiento de microorganismos de interés que son capaces de producir compuestos con valor agregado como lo son el ácido láctico, biodiésel o el etanol, además otra forma de aprovechar la pulpa de café es utilizarla como una fuente de materia prima en diferentes actividades como la alimentación animal, compostaje y la producción de fertilizante orgánico y biogás.

Por lo anterior en este trabajo, se identificaron los microorganismos aislados de la pulpa de café, las cepas que corresponden al tipo *Lactobacillus* para así establecer las condiciones de fermentación óptimas para el crecimiento de *Lactobacillus*, además de implementar estrategias como la hidrólisis ácida y la deshidratación parcial de pulpa de café para analizar cambios en las condiciones de crecimiento de cepas nativas de *Lactobacillus*.

## ANTECEDENTES

Según Jurado y Jarrín (2015) se evaluó el crecimiento de la cepa láctica *Lactobacillus lactis* a 3 niveles de pH diferentes (2.50, 4.50 y 7) en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) comercial, durante un periodo de 3 h a 32°C ajustando el pH. Se demostró que la cepa láctica presenta viabilidad al final de las 3 h, con valores de  $1.10 \times 10^{11}$  UFC/mL,  $2.10 \times 10^{10}$  UFC/mL y  $1.00 \times 10^{10}$  UFC/mL para pH 2.50, 4.50 y 7, respectivamente. Se observó el crecimiento del *Lactobacillus lactis* a 38°C y 45°C en donde se midió hasta las 14 h y 24 min teniendo en cuenta que es el tiempo necesario para que esta bacteria llegué a la fase estacionaria en el medio MRS mostrando crecimientos adecuados con valores de  $1.70 \times 10^{13}$  UFC/mL y  $1.40 \times 10^{13}$  UFC/mL para 45 °C y 38°C, respectivamente. Para la cepa de *Lactobacillus lactis* se usó agar y caldo MRS. Se prepararon 90 mL de caldo MRS estéril y 10 mL de la preparación que después permitió realizar el conteo de bacterias por mL. La fase exponencial de *Lactobacillus lactis* se obtuvo a las 14 h y 24 min con un crecimiento de  $1.30 \times 10^{13}$  UFC/mL en el medio MRS (Jurado y Jarrín, 2015).

Según Escobar et al. (2010) se usaron diferentes medios de cultivo como el agar y caldo de agua de peptona tamponada (APT) y un medio a base de suero clarificado para evaluar el crecimiento bacteriano del *Lactobacillus casei*. La cepa bacteriana se reactivó por rehidratación en caldo APT incubándola a 37°C durante 48 h, posterior a esto se preparó el inóculo para cultivo en suero clarificado el cual fue incubado a 37°C durante 24 h. El crecimiento de *Lactobacillus casei* se determinó a través de tres técnicas diferentes: espectrofotometría a 550 nm, recuento por dilución en placa y peso seco. Para ello se tomaron muestras cada 24 h por 172 h usando como medio de cultivo suero con adiciones de glucosa. Las cepas fermentadas se liofilizaron con el fin de prolongar su vida de almacenamiento y de esta manera obtener una mejor viabilidad de los microorganismos por más tiempo. En la evaluación del crecimiento bacteriano por espectrofotometría y recuento en placa se obtuvo que el pico máximo de crecimiento es a las 96 h, aunque a partir de las 72 h el crecimiento deja de ser exponencial, como se evidenció por el recuento en placa. Los mayores picos de producción de ácido láctico del *Lactobacillus casei* se observaron a las 99 h. El lacto suero clarificado sin adición de glucosa, permitió el crecimiento de microorganismos con una producción celular de  $5.90 \times 10^{10}$  UFC/mL de *Lactobacillus* en un periodo de incubación de 75 h y una producción de 70.39 g/L de ácido láctico. Y la mayor producción de ácido láctico fue de 76.24 g/L en suero con adición de 5% de glucosa a las 93 h (Escobar et al., 2010).

Según Castañeda y Gallo (2017), para el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaris*, se realizó un medio modificado a partir de afrecho de

café y cáscara de mandarina con medio MRS. La modificación consistió en una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico y calentamiento. Primero se realizó el aislamiento de la bacteria y se preparó el inóculo sembrando la misma a 37°C por 12 h en condiciones de microaerofilia. La fermentación fue realizada en medio modificado y puesta en la incubadora a 150 rpm a 37°C y un pH de 6.50 por 48 h con muestreo cada 4 h. Para la curva de crecimiento se tomaron muestras en iguales intervalos durante periodos de fermentación de 35 h y 45 h a 37° C y una concentración de azúcares reductores de 22 g/L de azúcares. En los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaris* se encontró que la etapa estacionaria en el medio MRS se alcanzó a las 15 h mientras que en el medio modificado ocurrió a las 20 h. La producción de ácido láctico obtenida en medio fermentativo MRS e hidrolizado de café alcanzó una concentración de 11.60 g/L superando a los medios fermentativos restantes (Castañeda y Gallo, 2017).

Plata et al. (2013) se enfocaron en caracterizar el lacto suero de leche de caprino, multiplicar la cepa *Lactobacillus Helveticus* y evaluar su pertinencia para la producción de ácido láctico. Se utilizó un diseño de cuadro greco latino llevando a cabo 16 cinéticas en un biofermentador intermitente. Para ello inocularon al 10% la cepa *Lactobacillus lactis* en el sustrato y elaboraron los 16 medios de cultivo con diferente composición. Los tratamientos consistieron en un sustrato básico de lacto-suero caprino, más un suplemento de vitaminas y minerales (extracto de levadura, riboflavina y sulfato de amonio). La mayor producción de ácido láctico fue de 17.72 g/L que se logró después de las 50 h para el medio que contenía extracto de levadura 2.50%, riboflavina 0.60% y sulfato de amonio 0.45% con el biofermentador operando a 42°C (Plata et al., 2013).

## 1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La pulpa de café representa en base húmeda aproximadamente el 44% del peso del fruto fresco y es el primer subproducto que se obtiene en el procesamiento del fruto de café. En promedio la producción de pulpa es de 2.25 ton/ha-año, por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra se generan 162.900 toneladas de pulpa fresca (Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia [CORANTIOQUIA], 2016).

En El Socorro, Santander se producen 6.250.000 kg de café pergamino seco que generan aproximadamente 16.969 toneladas de pulpa fresca, que de no ser utilizadas de manera adecuada pueden producir una contaminación equivalente a la generada un año, en excretas y orina, por una población de 90.493 habitantes (Alcaldía municipal de Socorro, Santander, 2016-2019).

La pulpa de café representa un gran problema ambiental principalmente para los pequeños caficultores quienes por falta de recursos económicos y/o desconocimiento no hacen uso de las nuevas tecnologías o de alternativas que ayudan a la disminución de los impactos causados por su incorrecta disposición (Moreno y Romero, 2016). En el caso de El Socorro, Santander según el plan de desarrollo, el municipio cuenta con 960 caficultores de los cuales solo 280 tienen el sello “Rainforest Alliance”, es decir que el 29% de las fincas dedicadas a esta actividad productiva tienen un modelo de minimización del impacto ambiental, frente a un 71% restante que sigue causando afectaciones ambientales.

Cuando la pulpa de café se dispone sin ningún tratamiento en el mismo sitio en donde se realizó el despulpado, esta se convierte en un potencial contaminante para las aguas superficiales y subterráneas, por medio de los lixiviados que se generan en el proceso de descomposición y los conformados por el arrastre de sus componentes por las lluvias, en el caso de que la pulpa no sea almacenada en lugares cubiertos (Moreno y Romero, 2016).

La pulpa de café puede generar grandes afectaciones a los cuerpos hídricos ya que cuando es depositada a las corrientes de agua sin ningún tratamiento previo se genera un aumento considerable en la demanda bioquímica de oxígeno, aumento de la carga de sólidos totales, generación de olores y cambios en los componentes químicos del agua que contribuyen a la disminución de la biota acuática (Urquijo Trujillo, 2016). Cuando la pulpa llega a las fuentes hídricas debido a la disposición inadecuada de este residuo, esta puede reducir la calidad del cuerpo de agua y del suelo siendo perjudicial para el medio ambiente, esto ocurre por el alto contenido de azúcares que provoca la fermentación, proceso en el que se estimula la separación rápida de las enzimas contenidas en las bacterias



de la pulpa de café (Novita, 2015). Esto ocasiona que los microorganismos presenten una demanda mayor de oxígeno para su descomposición y generen de esta manera asfixia de la biota acuática. En el caso del suelo cuando la pulpa de café se descompone de manera no controlada, se producen problemas fitosanitarios y contaminación cruzada (Serna et al., 2018).

Por las razones previamente expuestas, se hace necesaria la búsqueda de múltiples alternativas de aprovechamiento de la pulpa de café que minimice el impacto ambiental asociado y genere valor agregado al proceso. En esta perspectiva, en el presente trabajo se propone el uso de pulpa de café como sustrato para el crecimiento de bacterias del tipo *Lactobacillus* de interés en múltiples procesos industriales.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Cenicafé ha realizado diferentes investigaciones en las cuales se centra en las prácticas y procesos para el adecuado manejo y tratamiento que se le debe realizar a los residuos que genera la producción del café, con el objetivo de minimizar impactos ambientales que puedan afectar al sector cafetero generando pérdidas económicas irreparables para los productores y la comunidad en general.

La pulpa de café constituye un riesgo para el medio ambiente sino se utiliza de manera adecuada para otros propósitos (Álvarez et al., 2011). Por este motivo se buscó proponer un manejo apropiado de los residuos generados en el proceso del beneficio del café identificando las condiciones óptimas para el crecimiento de cepas tipo *Lactobacillus* en un proceso de fermentación que permitiesen la obtención de ácido láctico utilizando como sustrato la pulpa de café y teniendo como posibilidad que se pueda convertir en un beneficio económico en lugar de un desecho precursor de la contaminación en caso de una disposición incorrecta.

El ácido láctico es un ácido orgánico natural de gran importancia y valor en la industria como lo es la farmacéutica, cosmética, alimentaria es decir tiene un amplio uso en la industria, esto se debe a las diferentes características benéficas con las que esta cuenta, además de su alto potencial al ser utilizado como materia prima en la producción de polímeros biodegradables (Waldir et al., 2007). Actualmente el ácido láctico puede ser obtenido por síntesis química o por procesos de fermentación, siendo este último la forma más económica y eficaz para producirlo (Rojas et al., 2015). Los costos de investigación son variables, pero su principal desventaja es hacer eficiente el método de separación del ácido láctico.

Este proyecto buscó estandarizar la técnica de fermentación de la pulpa de café y determinar, desde la perspectiva microbiológica, cuáles son las mejores condiciones de crecimiento en las que se desarrollan las bacterias tipo *Lactobacillus*, así como los cambios en sus condiciones de crecimiento al evaluar diferentes estrategias de modificación de la pulpa.

Aunque no se tienen muchos registros de investigaciones similares en la región se buscó plantear alternativas de manejo de la pulpa con este proyecto, planteando un posible emprendimiento productivo a mediano plazo con los productores de la región. En una segunda fase del proyecto, se buscará poder extraer el ácido láctico producido por las bacterias para la síntesis de biopolímeros que ayudarían a mitigar la creciente crisis generada por el aumento en el consumo de plásticos de un solo uso especialmente en los últimos años.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Identificar las condiciones óptimas en un proceso de fermentación para cepas tipo *Lactobacillus* aisladas de pulpa de café.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar entre los microorganismos aislados de la pulpa de café, las cepas que corresponden al tipo *Lactobacillus*.
- Establecer condiciones de fermentación óptimas para el crecimiento de *Lactobacillus*.
- Implementar estrategias de hidrólisis ácida y deshidratación parcial de pulpa de café para analizar cambios en las condiciones de crecimiento de cepas nativas de *Lactobacillus*.

## **4. MARCO TEÓRICO**

Para el desarrollo de este trabajo es importante tener en cuenta las consecuencias que tiene el impacto ambiental generado por la incorrecta disposición de los residuos del café específicamente la pulpa de café.

### **4.1. IMPACTO AMBIENTAL**

El impacto ambiental es el cambio en el medio ambiente, ya sea desfavorable o beneficioso, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales de una organización (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación [ICONTEC], 2015). En este caso es visto como cambios que se ven en el medio ambiente debido al desarrollo de la producción del café.

La caficultura ha existido desde tiempos remotos y genera impactos negativos desde su cultivo hasta su procesamiento, esto causa cambios en el medio ambiente como resultado de sus diferentes actividades (Ramírez González, 2016). Entre algunos de los impactos ambientales que se producen se encuentran:

#### **4.1.1. Deforestación**

Los bosques intercambian el CO<sub>2</sub> entre la biosfera y la atmósfera almacenando una cantidad importante de carbono tanto de la vegetación como de los suelos, es así que actúan como sumideros capturando el CO<sub>2</sub> y convirtiéndolo en carbohidratos, mediante la fotosíntesis (Pineda et al., 2005). La reciente expansión agrícola conlleva a la desaparición de estas áreas boscosas puesto que los productores intervienen en bosques o vegetación secundaria en la búsqueda de suelos de mejor calidad para sus cultivos (González et al., 2018), tal es el caso de la tala o quema de árboles para la siembra de cultivos de café. Cuando se deforestan estas áreas se liberan miles de millones de toneladas de dióxido de carbono en la atmósfera y se contribuye a la acumulación de gases que producen el efecto invernadero al destruir valiosos “sumideros de carbono” aparte de esto también causa la pérdida de hábitat para una gran cantidad de especies y la extinción de miles de estas todos los años (Kamal, 2017).

#### **4.1.2. Pérdida de biodiversidad**

La intensificación del sistema de producción de café impacta directamente la biodiversidad, debido a que va degradando la cobertura vegetal y reduciendo el número de especies animales y vegetales de la zona de plantación (Rojas et al., 2012).

#### **4.1.3. Contaminación agroquímica**

El cultivo de café con exposición solar al contrario de los sistemas tradicionales de café bajo sombra depende de una progresiva utilización de fertilizantes y pesticidas químicos, el uso de estos puede generar contaminación en los recursos suelo, agua y aire debido a la naturaleza sintética de los compuestos que contienen (Ramírez González, 2016).

#### **4.1.4. Erosión del suelo**

La erosión es un fenómeno geológico natural que se origina por la combinación de factores como el clima, pendientes largas y pronunciadas, inadecuada utilización del suelo y la escasa o ninguna cobertura vegetal. El suelo posee características propias que lo pueden hacer más propenso a ésta como el bajo contenido de materia orgánica o el escaso desarrollo de los horizontes del suelo (Hincapié y Ramírez, 2010). En Colombia, el 97% de la erosión es causada por la lluvia y se asocia con áreas cultivadas con café principalmente en los tiempos de fuertes lluvias sobre todo en terrenos con pendientes sometidas a la deforestación y al monocultivo durante mucho tiempo, además de que estos causan un significativo deterioro de la calidad del suelo lo cual también contribuye a la erosión. En la zona cafetera se estima que las pérdidas de suelo por erosión en el cultivo de café son del orden de 6 a 30 t/ha/año (Quiroz e Hincapié, 2007). La erosión hídrica dada en la zona cafetera se ha presentado de una manera más acelerada por diferentes factores como la localización inapropiada de los cultivos, los suelos totalmente desnudos por el uso generalizado y reiterado de herbicidas, el efecto de las quemadas, el laboreo excesivo del suelo y el manejo inadecuado de las aguas de escorrentía. La erosión es un gran problema ambiental debido a que reduce la fertilidad del suelo y la capacidad de almacenamiento de agua en el suelo es por esto que cuando se presenta se reduce la tasa de infiltración, la escorrentía aumenta y la capacidad de almacenamiento de agua disminuye (Quiroz e Hincapié, 2007).

#### **4.1.5. Afectación al suelo**

La pulpa de café tiene pH ácido y alta carga de fenoles y polifenoles que son sustancias reconocidas como tóxicas para la mayoría de especies de artrópodos y microorganismos. Un alto contenido de pulpa de café en los suelos puede afectar las poblaciones de la microflora edáfica, donde los hongos acidófilos son los principales microorganismos que metabolizan todo ese volumen de materia orgánica (Cervantes et al., 2015).

#### **4.1.6. Uso del agua**

Para el beneficio del café que requiere el empleo de beneficio tradicional se estima que el uso de agua se encuentra entre 40 L y 60 L de agua para la obtención de

1.00 kg de café pergamino seco, teniendo en cuenta todas las actividades de transporte, despulpe, fermentación, clasificación y lavado del beneficio tradicional (Ramírez González, 2016).

Colombia, es un país de vocación agrícola, recibió el cultivo de café por primera vez en el siglo XIX, convirtiéndose en un cultivo de gran importancia y gracias a este ha sido reconocido como un productor potencial de café a nivel mundial (Capera y Sánchez, 2018), es por esto que la caficultura se convirtió en el motor de desarrollo de la economía rural de Colombia, siendo el ingreso de más de 550 mil familias lo que la convierte en una actividad social y económica fundamental para el país (FNC, 2014), sin embargo, esta actividad trae consigo una problemática ambiental generada por el inadecuado tratamiento, aprovechamiento y/o disposición final de los residuos (pulpa y mucílago), los cuales son vertidos en botaderos a cielo abierto y a las fuentes de agua como una alternativa de manejo por parte de algunos caficultores (Capera y Sánchez, 2018).

El alto consumo de café a nivel mundial ha hecho que su producción se concentre cada vez más en las zonas aptas para su producción, generando enormes cantidades de desechos (pulpa y mucílago) con un impacto ambiental elevado (Capera y Sánchez, 2018). La etapa de beneficio húmedo del café es la que genera el mayor impacto ambiental negativo sobre los ecosistemas, debido a que el vertimiento de líquidos contaminantes y las emisiones atmosféricas generan desequilibrios en el recurso suelo, agua, y aire (Ramírez González, 2016).

La pulpa de café se considera como la mayor generadora de impactos negativos ambientales sobre los ecosistemas ya que es la responsable de las tres cuartas partes de la contaminación potencial que se puede producir en los beneficiaderos de café (Yarumo, 2016). La pulpa tradicionalmente es depositada en las fuentes hídricas, por lo que se genera un aumento significativo en la demanda bioquímica de oxígeno, incrementando la temperatura del agua, aumentando la carga de sólidos totales, ocasionando la pérdida de la calidad visual y generando olores que contribuyen en la proliferación de vectores. Esta disposición inadecuada de la pulpa se da principalmente en épocas de cosecha y es considerada una forma de contaminación severa del agua, imposibilitando el aprovechamiento del recurso hídrico para acueductos, afectando la fauna acuática y limitando los recursos recreativos (Ramírez González, 2016).

Como una estrategia para disminuir los múltiples impactos ambientales descritos se plantea buscar usos alternativos para la pulpa de café. Para ello es fundamental entender cómo es su estructura y composición.

## 4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LA PULPA DE CAFÉ

### 4.2.1. Composición de la pulpa de café

La pulpa de café representa el 29% del peso del fruto en base seca. La pulpa durante muchos años fue considerada como un desecho en la producción cafetera, recientemente se descubrió que contiene proteínas, minerales, taninos, cafeína, potasio, polifenoles y carbohidratos que pueden usarse como materia prima para nuevos procesos, por medio de la extracción de los mismos (Serna et al., 2018). Por lo mismo es posible usarla como un sustrato para el crecimiento de microorganismos que puedan generar diferentes compuestos con valor agregado, fruto de procesos de fermentación. Con ello, no sólo se aprovecha la pulpa de café reduciendo el impacto ambiental asociado a su mala disposición final; sino que también se abren posibles nuevos emprendimientos para el sector cafetero. En la tabla 1 se muestran los valores nutricionales presentes en la pulpa de café.

**Tabla 1.** Valores nutricionales de la pulpa de café

COMPONENTE	%
Carbohidratos	50
Fibra	20
Proteínas	7-10
Grasas	1.40 - 2.50
Cafeína	0.68 – 1.30

**Fuente.** (Samayoa et al., 2014) pág. 74

En la tabla 2 se muestra la composición química de la pulpa de café que, al ser desechada como sólido no reutilizable puede sufrir un proceso de fermentación y aumentar la carga orgánica de la matriz (suelo/agua) que lo contiene. Aun así, este material tiene la ventaja de que puede ser utilizado como abono orgánico o en forma de compostaje. Algunos de los compuestos orgánicos encontrados en la pulpa son los azúcares reductores y no reductores (Samayoa et al., 2014).

**Tabla 2.** Composición química de la pulpa de café

DETERMINACIÓN	VALOR
pH	4.40
Humedad (%)	74.83
COMPUESTO	%BASE SECA
Taninos	1.80 – 8.56
Sustancias péctidas totales	6.50
Azúcares reductores	12.40
Azúcares no reductores	2.00
Cafeína	1.30
Ácido clorogénico	2.60
Ácido cafeico total	1.60
Contenido celular	63.20
Fibra detergente neutral	36.80
Fibra detergente ácida	34.50
Hemicelulosa	2.30
Celulosa	17.70
Lignina	17.50
Proteína lignificada	3.00
Proteína cruda	10.10
Cenizas insolubles	0.40

**Fuente.** (Samayoa et al., 2014) pág. 23

#### **4.2.2. Estructura de la pulpa de café**

La pulpa está formada por el pericarpio (piel), el cual a su vez está formado por el exocarpio y el mesocarpio como se muestra en la figura 1, esta presenta una textura fibrosa, de coloración amarillenta y con sabor dulce (Martínez et al., 2019). A medida que el fruto alcanza su madurez, el pericarpio sufre una serie de transformaciones químicas (aumento de contenido de agua, azúcares y taninos) y estructurales (tamaño, forma, engrosamiento y lignificación de las paredes celulares). El exocarpio es una estructura de estomas, formado de una sola capa discontinua de células deformes, formado de una sola capa discontinua de células deformes, de paredes gruesas y cutinizadas. En el mesocarpio las capas más



externas están formadas por células grandes, poligonales y de paredes lignificadas y gruesas con vestigios de protoplastos en su interior. El endocarpio formará finalmente el pergamino de la almendra (Rojas Vallejos, 2016).

**Figura 1.** Partes del fruto de pulpa de café



**Fuente.** (Rojas, 2016) pág.7

Dada la composición química de la pulpa de café, el alto contenido de humedad y su valoración como desecho en el beneficio tradicional del café, es común encontrar microorganismos que pueden usar este material como fuente de carbono y nutrientes, convirtiéndolo en una posible fuente de biomasa para producción de posibles compuestos derivados de la industria cafetera.

#### **4.3. MICROORGANISMOS**

##### **4.3.1. Bacterias gram positivas**

Las bacterias gram positivas son aquellas que se tiñen de color azul oscuro o violeta por la tinción de gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana (Pino, 2017).

Su pared celular, está formada en un 90% por peptidoglucano, el cual gracias al grosor que proporciona mantiene la coloración de cristal violeta permitiendo así

diferenciarlas de bacterias gram negativas. Además, estas bacterias presentan ácidos teicoicos que son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, estos se presentan embebidos en la pared celular de la bacteria como polisacáridos ácidos (Pino, 2010).

Las bacterias gram positivas pueden ser bacilos catalasa-negativos, no esporulados, inmóviles, dentro de estas se encuentran las especies de *Lactobacillus* que pueden ser anaerobios facultativos o microaerófilos. A estas se les divide en homofermentativas si degradan glucosa produciendo sólo ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol o acetato (Carrillo y Audisio, 2007).

#### **4.3.2. Bacterias anaerobias**

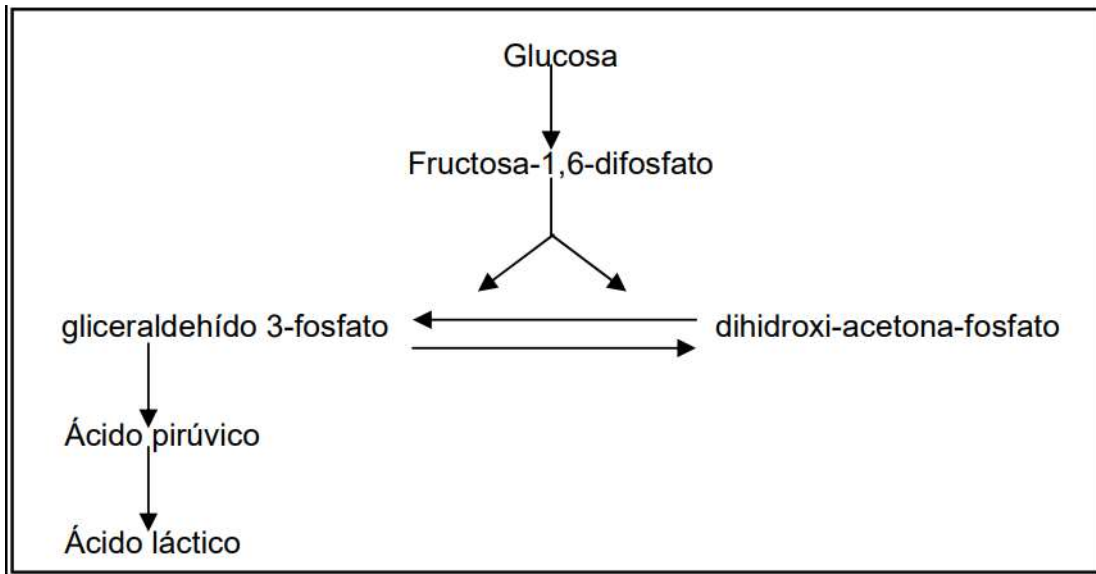
Las bacterias anaerobias son aquellas que crecen en ausencia de oxígeno. Poseen un metabolismo de tipo fermentativo, en el cual las sustancias orgánicas son lasceptoras finales de electrones, aunque también pueden obtener energía a partir de la respiración anaerobia. Otras características comunes son sus requerimientos nutricionales complejos, su lento crecimiento y su labilidad, lo cual, sumado a sus requerimientos atmosféricos estrictos (de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) hacen que su aislamiento sea difícil (Universidad de la República, Departamento de Bacterología y Virología, 2006).

#### **4.3.3. Fermentación anaerobia**

La fermentación anaerobia incluye un complejo número de microorganismos con diferentes características y capacidades, durante el proceso de producción del metabolito los productos finales son sustancias orgánicas como el ácido láctico. Los microorganismos anaerobios producen menos energía que los aerobios por lo que suplen sus necesidades de energía metabolizando una mayor cantidad de azúcares y elaborando así una mayor cantidad de metabolitos. Las bacterias anaerobias fermentativas utilizan rutas catabólicas de polisacáridos, aminoácidos y glicerol para la producción de glucosa, que puede ser usada en la ruta de fermentación alcohólica, láctica y acética (Corrales et al., 2015).

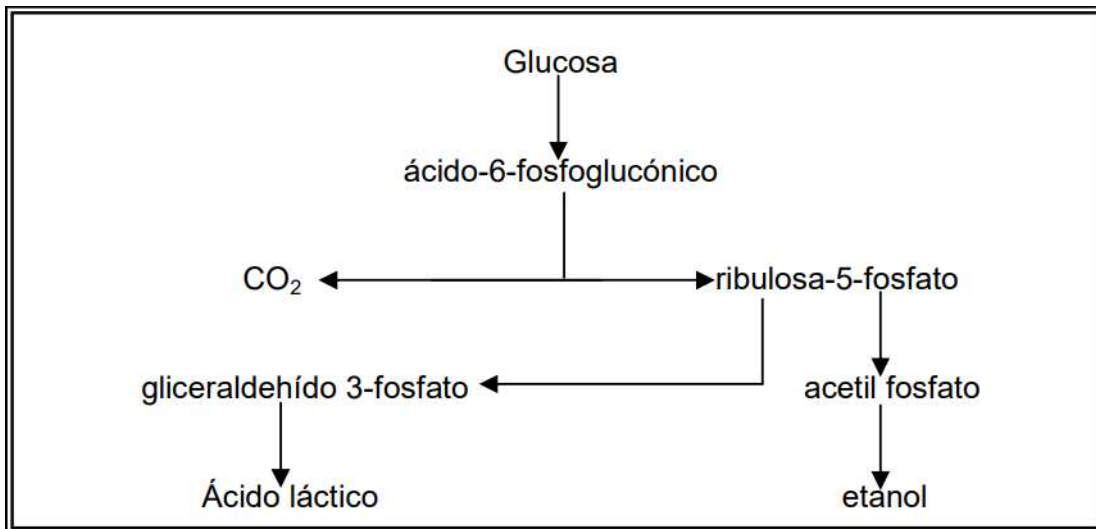
Entre algunas de las bacterias que realizan fermentación láctica se encuentran las bacterias ácido lácticas como las del género *Lactobacillus* que son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basadas en el producto final de su fermentación. En el caso de las homofermentadoras estas bacterias poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis como se observa en la figura 2. Por su parte las heterofermentadoras convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfoacetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO<sub>2</sub> como se observa en la figura 3 (Ramírez et al., 2011).

**Figura 2.** Fermentación láctica homofermentativa



**Fuente.** (Cabeza Herrera, 2006) pág. 3

**Figura 3.** Fermentación láctica heterofermentativa



**Fuente.** (Cabeza Herrera, 2006) pág. 3

#### 4.4. IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA

Existe una gran diversidad en cuanto a los sistemas de clasificación de las bacterias, el más usual o que frecuentemente se usa en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, se debe tener en cuenta que para llevar a cabo la

identificación de una bacteria debe existir la asignación a un taxón esto según a la clasificación que nos arroje, es decir que este proceso radica en la determinación de las diferentes características fenotípicas y/o genotípicas con respecto a la comparación entre estas características y la diversidad de taxones de la clasificación en general, además es de suma importancia recalcar que las características que se pretenden determinar y la cantidad dependen del tipo de la bacteria y de su principal identificación (Seminario de pruebas bioquímicas, s.f.). Existen una serie de pasos desde el punto de vista bioquímico que su única finalidad es la posible identificación de las cepas bacterianas los cuales son:

1. Se debe acceder a un cultivo que sea puro, es decir que para este tipo de cultivo todos los microorganismos que estén presente solo pueden provenir de una única célula.
2. Se debe realizar una revisión exhaustiva a este tipo de células además de llevar a cabo coloraciones de Gram, esto con el fin de determinar la forma de los microorganismos.
3. Establecer las características nutricionales por medio de diferentes métodos como lo son en el cultivo anteriormente mencionado y de aislamiento.
4. Efectuar las diferentes pruebas primarias en las cuales se determinan forma y género a la que pertenece, algunas de estas pruebas son catalasa, oxidasa, entre otras.
5. Por último se llevan a cabo las pruebas secundarias y terciarias estas se hacen con el fin de llegar al tipo de especie como por ejemplo sin producción de pigmentos y de coagulasa.

#### **4.5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE ENSILAJE**

El ácido láctico cuenta con un grupo hidroxilo y un carboxilo en su estructura, lo que le confiere una excelente reactividad, siendo de esta manera considerado un químico valioso debido a su cantidad de diferentes usos en varias industrias (Arias et al., 2009). Este ácido se puede obtener por vía fermentativa, sin embargo, tiene algunos factores limitantes en la producción de ácido como la baja concentración de bacterias lácticas en el sistema y la inhibición del crecimiento por el producto (Waldir et al., 2007).

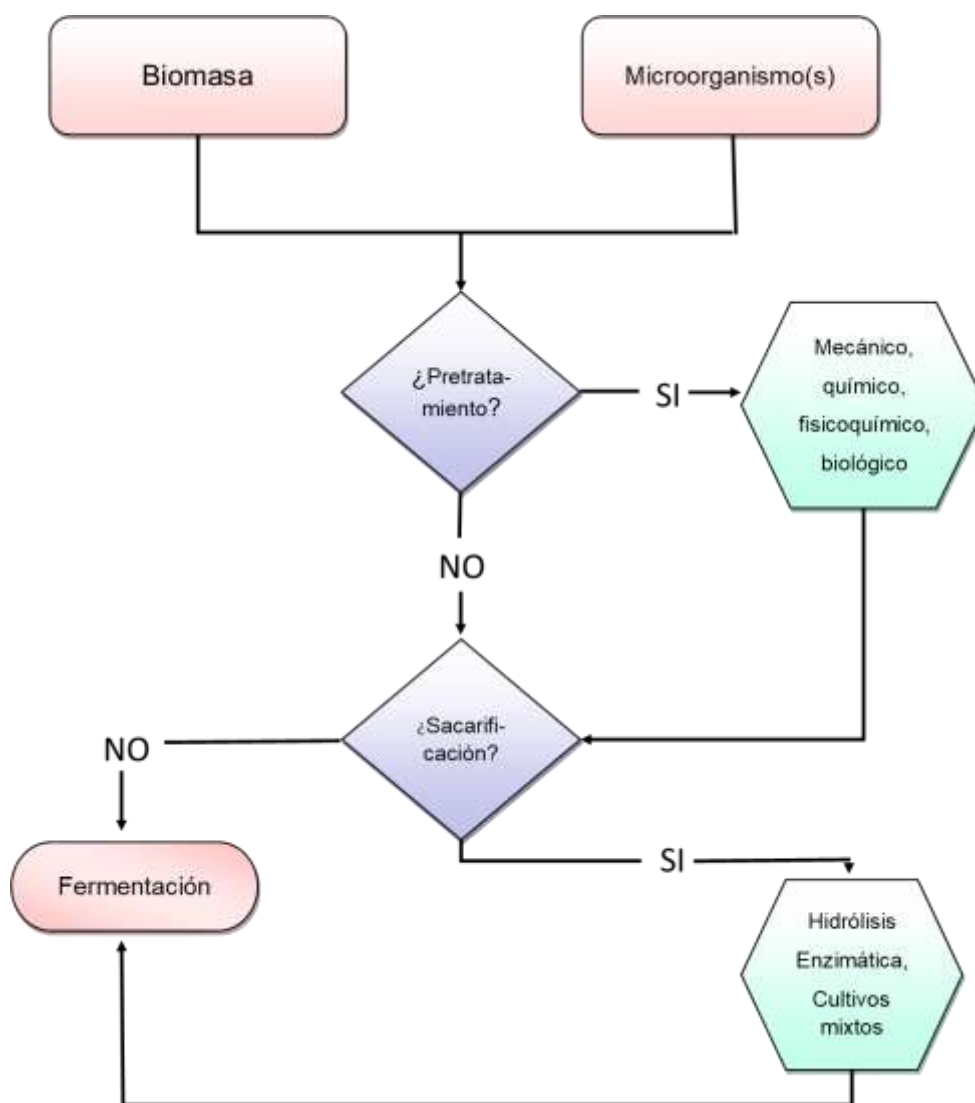
La pulpa de café puede servir como sustrato para la conversión de ácido láctico, gracias a la fermentación con microorganismos anaerobios. Esta biomasa sirve como fuente de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos, a expensas de la conversión de azúcares simples en metabolitos de interés como el ácido láctico. Los microorganismos usados en la fermentación para la producción de ácido láctico pueden ser bacterias y hongos, sin embargo, las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más utilizadas (Vuan Lanusse, 2018).

Entre las BAL se encuentran los *Lactobacillus* que son bastante apreciados por su capacidad de fermentar diversas fuentes de carbono simples para producir ácido

láctico y porque muchas de estas bacterias pueden sobrevivir a condiciones de acidez y alcalinidad extremas (León et al., 2013). La mayoría de los *Lactobacillus* tienen alta tolerancia al pH por debajo de 5 y el crecimiento óptimo está en un rango entre 20°C y 40°C (Castañeda y Gallo, 2017). Los *Lactobacillus* desempeñan un papel principal en la conservación de una cosecha dado que pueden tolerar una acidez mucho mayor que otros microorganismos. De esta manera cuando se ensila un cultivo, fermentan los azúcares presentes en el material vegetal, produciendo una cantidad de ácido láctico en la que, debido a la disminución del pH, los microorganismos diferentes a *Lactobacillus* no pueden crecer (Suzuki López, 1990).

Una vez se selecciona la biomasa y los microorganismos, la producción de ácido láctico se realiza de acuerdo con la figura 4.

**Figura 4.** Proceso de producción de ácido láctico



**Fuente.** (Vuan Lanusse, 2018) pág. 32

El sustrato de la pulpa de café puede ser utilizado directamente durante la fermentación o en algunos casos puede requerir de algún tratamiento ya sea para la obtención de azúcares fermentables, o la descomposición parcial de la biomasa la cual debe ser sometida después a la sacarificación, con el fin de obtener azúcares fermentables puesto que algunos microorganismos son incapaces de asimilar la biomasa directamente y se debe aplicar tratamientos con el fin de convertirlos en compuestos de fácil asimilación (Vuan Lanusse, 2018). En el caso de este proyecto, en el segundo ensayo, se realizaron dos tratamientos a la pulpa de café para la sacarificación de la biomasa evaluando su efectividad en la producción de ácido láctico: Hidrólisis ácida y secado.

En la hidrólisis ácida se puede obtener hasta un 90% de rendimiento por lo que es considerado un tratamiento de bajo costo, en este pretratamiento de la pulpa de café, se utilizan ácidos diluidos (menos de 4%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a temperaturas elevadas de entre 130 °C y 200 °C y puede tomar desde 2 min a 80 min. En este caso el mecanismo de degradación de polisacáridos en monómeros está asociado a la ruptura de enlaces glucosídicos. En este tratamiento de la biomasa, el ácido tiene la capacidad de actuar como un catalizador y como resultado se obtiene la despolimerización de los polisacáridos como la celulosa presente en la pulpa y con ello aumentar la cantidad de azúcares reductores que pueden ser fermentados y convertidos en ácido láctico (Vuan Lanusse, 2018).

En algunas ocasiones no es necesario el proceso de sacarificación dado que el microorganismo tiene la capacidad de convertir la biomasa directamente en ácido láctico con buena eficiencia (Vuan Lanusse, 2018).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. VARIABLES

Las variables dependiente e independiente fueron establecidas a partir de los objetivos y se describen en las tablas 3 y 4. El objetivo principal apunta a mejorar la producción de ácido láctico y por lo tanto en cada uno de los ensayos se evaluaron diferentes estrategias (variables independientes) para determinar la cantidad de UFC/mL de *Lactobacillus* (variable independiente).

En la tabla 3 se muestran las variables que corresponden al primer ensayo.

**Tabla 3.** Variables del primer ensayo

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	UNIDAD
Dependiente	UFC de <i>Lactobacillus</i>	UFC/mL
Independiente	Pulpa de café	%
	Inóculo	%
	Tiempo de fermentación	Horas
Interviniente	Clima	°C
	Maduración del café	-----

**Fuente.** Autoras (2020)

En la tabla 4 se muestran las variables para el segundo ensayo

**Tabla 4.** Variables del segundo ensayo

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	UNIDAD
Dependiente	UFC de <i>Lactobacillus</i>	UFC/mL
Independiente	Tratamiento 1:	---
	Hidrólisis ácida	
	Tratamiento 2:	----

Deshidratación parcial		
Control: ----		
Pulpa sin tratamiento		
Interviniente	Clima	°C
	Maduración del café	-----
<b>Fuente.</b> Autoras (2020)		

## 5.2. EQUIPOS Y REACTIVOS

Los reactivos utilizados para la investigación fueron específicos para pruebas de tipo microbiológicas.

### 5.2.1. Equipos

- Autoclave Vítale plus 21 Marca CRISTOFOLI
- Espectrofotómetro Marca HACH DR 3900
- Incubadora Marca Memmert
- Microscopio Marca Thomson
- Balanza digital Marca Kern
- Trituradora Marca Kalley
- Licuadora Marca Kalley
- pHmetro Marca Smarth Sensor

### 5.2.2. Reactivos

- Agar MRS Marca Merk KGaA
- Caldo MRS Marca Merk KGaA
- Agar Plate Count Marca Merk KGaA
- Safranina Marca Hycel
- Lugol Marca Albor
- Azul de metileno Marca Hycel
- Cristal violeta Marca Biopack
- Cloruro de Bario Marca Himedia
- Ácido sulfúrico Marca Honeywell
- Agar Sangre Marca Merk KGaA
- Agar MacConkey Marca Merk KGaA
- Peroxide-Test Marca MQuant
- Oxidase-Test Marca MQuant



### **5.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

El software Statgraphics plus se empleó para identificar las posibles combinaciones de los experimentos por medio de este se obtuvieron las repeticiones por cada ensayo y se utilizó solamente para planificar el experimento. El posterior análisis de los resultados se realizó con Excel con el que se generaron las tablas y gráficas que se presentan en este trabajo.

Se realizaron dos diseños experimentales para optimizar el proceso de fermentación de la pulpa de café. El primer ensayo fue un diseño factorial 3x3 con tres variables dependientes (UFC/mL *Lactobacillus*, ácido láctico y azúcares) y tres variables independientes (%pulpa de café, % inóculo y tiempo de fermentación). Se aclara que los resultados pertenecientes a concentración de ácido láctico o concentración de azúcares no se mencionan en detalle, sino que sirven de guía para elegir las mejores condiciones para el crecimiento óptimo de *Lactobacillus* que es el objetivo principal del presente trabajo. El segundo ensayo también fue un diseño factorial 3x3 con las mismas variables dependientes del primer ensayo y tres variables independientes que correspondían a los tratamientos de la pulpa de café (Pulpa de café sin tratamiento, pulpa de café con deshidratación parcial y pulpa con hidrólisis ácida).

### **5.4. POBLACIÓN Y MUESTRA**

El universo de muestra fue la recolección de café en la finca La Palma la cual fue aproximadamente de 40 kg. De este universo muestral se seleccionó aleatoriamente una población equivalente a 12 kg y se tomaron las siguientes muestras: 11 kg para hacer el ensilaje, 5 g para hacer la modificación de medios de cultivo y 687 g para la preparación del sustrato. En cuanto al segundo ensayo se tomó una población de 2 kg y de esa las siguientes muestras: se tomaron 225 g para la preparación de los tres tratamientos (Deshidratación parcial, Hidrólisis ácida y pulpa de café sin tratamiento) y 1500 g para el ensilaje inicial de la pulpa.

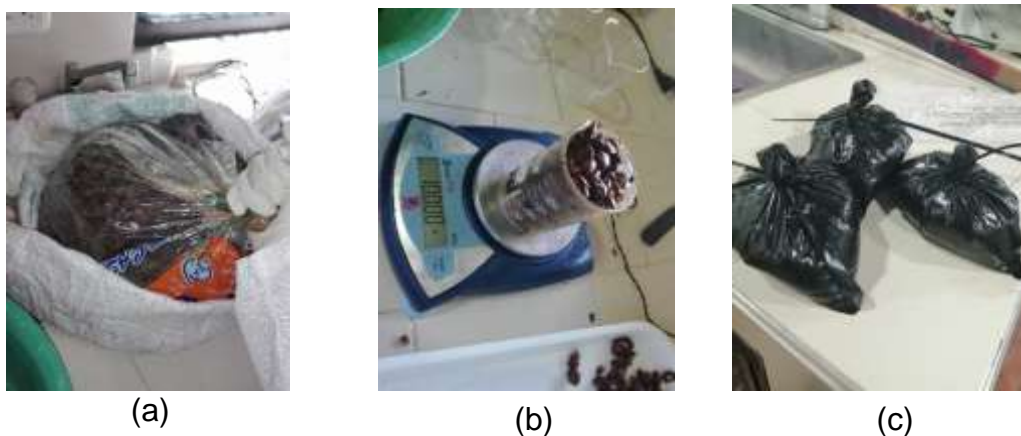
### **5.5. ENSAYOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

#### **5.5.1. Obtención de la primera muestra y ensilaje primer ensayo:**

Se tomaron 11 kg de pulpa de café obtenida mediante el proceso de beneficio ecológico del café (BELCOSUB) proveniente de la vereda Quitasol del municipio de Guadalupe, Santander. Para realizar el ensilaje se pesaron 500 g de pulpa de café y se empacó en una bolsa de polietileno calibre 8, se sacó todo el aire y se

selló con un precinto. Se realizaron 22 ensilajes de la misma manera los cuales fueron incubados en un sitio oscuro a temperatura ambiente para la fermentación durante 8 días. De esta pulpa de café se tomó una muestra y se sembró en medios de cultivo agar sangre y MacConkey, se incubaron a 37°C en la incubadora marca Memmert en donde se dejaron durante 24 h. Después se realizaron tinciones de Gram a las colonias obtenidas para su aislamiento e identificación. En la figura 5 se muestra el proceso de ensilaje:

**Figura 5.** Proceso de ensilaje del primer ensayo (a, b y c)



**Fuente.** Autoras (2020)

#### **5.5.2. Modificaciones de los medios de cultivo**

Se modificó el agar base agregándole pulpa de café, para ello se pesaron 5 g de pulpa de café, se licuaron y se les adiciono 95 mL de agua destilada con el fin de aforarlo a un volumen de 100 mL, luego se filtró y del líquido decantado se tomaron 5 mL que se adicionaron al agar.

#### **5.5.3. Siembra de colonias aisladas del medio de cultivo modificado**

Las colonias aisladas que cumplieron con las características blanquecinas, de bordes uniformes, tamaño medio y que en la tinción de Gram correspondían a bacilos gram positivos fueron sembrados en medio modificado.

#### **5.5.4. Prueba de catalasa y oxidasa**

A las colonias aisladas se les realizó la prueba de la catalasa y la oxidasa, la cual se usó para identificar la presencia de *Lactobacillus* puesto que estas bacterias productoras de ácido láctico se caracterizan por presentar catalasa y oxidasa negativas (Ortiz Balderas, 2006).

**5.5.4.1. Prueba de catalasa.** Se tomó la colonia aislada del medio de cultivo modificado y se colocó una pequeña muestra sobre un portaobjetos, luego se le agregó una gota de peróxido de oxígeno. La formación de burbujas se identificó como prueba positiva (Ortiz Balderas, 2006).

**5.5.4.2. Prueba de la oxidasa.** Se tomó un trozo de papel de filtro y se le agregó una muestra de la colonia aislada, se comparó con el color del frasco. Se observó si la colonia tiende a cambiar de color (rosa-rojo-negro); la presencia de estos colores señaló la positividad de la prueba mientras que el color blanco fue tomado como prueba negativa (Ortiz Balderas, 2006).

Las colonias caracterizadas se sembraron en agar MRS y caldo MRS y estas se utilizaron en el primer ensayo.

## **5.6. FERMENTACIÓN EN PRESENCIA DE PULPA DE CAFÉ: PRIMER DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

### **5.6.1. Preparación del inóculo**

Las bacterias aisladas se sometieron a un proceso de crecimiento en agar MRS durante 24 h a 37°C en la incubadora, luego se prepararon inóculos al 1%, 2.50% y 4% con las colonias aisladas y escogidas de las pruebas de catalasa y oxidasa. En la figura 6 se observa el inóculo preparado.

**Figura 6.** Inóculo preparado



**Fuente.** Autoras (2020)

### 5.6.2. Preparación del sustrato

Se recolectó pulpa de café por medio del proceso BELCOSUB. Para preparar el sustrato se licuó la pulpa de café con agua destilada al 10%, 15% y 20% como se observa en la figura 7.

**Figura 7.** Preparación de Sustrato



**Fuente.** Autoras (2020)

### 5.6.3. Preparación de la fermentación: primer diseño

Se realizó un diseño de experimentos con tres factores (pulpa, inóculo y tiempo) en tres niveles para cada uno y cuatro réplicas por muestra. Se identificó como variable de respuesta las unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos en cada experimento.

Para preparar cada muestra se agregaron 30 mL del sustrato de la pulpa al 10%, 15% o 20% en reactores artesanales debidamente esterilizados, posteriormente se agregó la cantidad de inóculo mostrada en la tabla 5, se tapó y selló con cinta teflón. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C como se observa en la figura 8. A las 24 h, 60 h y 96 h respectivamente se extrajeron muestras para realizar el conteo de microorganismos.

**Tabla 5.** Cantidad de inóculo agregado a cada muestra

Inóculo	mL agregados a cada frasco
1%	0,30
2.50%	0,75
4%	1,20

**Fuente.** Autoras (2020)

**Figura 8.** Incubación de Muestras



**Fuente.** Autoras (2020)

## **5.7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN: SEGUNDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

### **5.7.1. Preparación ensilaje del segundo ensayo**

Para el ensilaje se pesaron 500 g de pulpa y se trituraron posteriormente se empacó en una bolsa de polietileno calibre 8 y se selló con un precinto como se muestra en la figura 9. Se realizaron tres ensilajes de la misma manera y se dejaron 8 días para una mejor fermentación.

**Figura 9.** Preparación ensilaje del segundo ensayo (a, b y c)



(a)



(b)



(c)

**Fuente.** Autoras (2020)

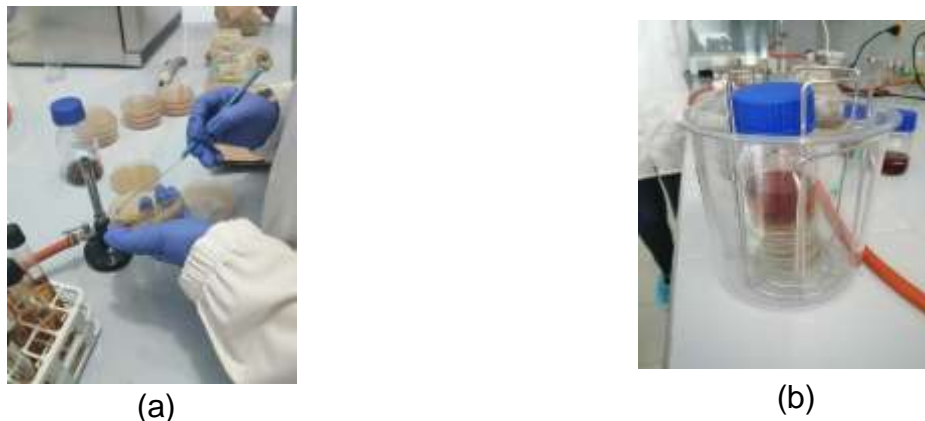
### 5.7.2. Preparación de colonias del ensilaje segundo ensayo

Se prepararon 200 mL de caldo y agar MRS, sembrando una muestra del ensilaje en superficie en agar MRS y caldo MRS. Se incubó por 48 h a 35°C en aerobiosis y anaerobiosis, como se observa en la figura 10, y se realizó una identificación morfológica por tinciones de Gram cuando se finalizó el proceso de incubación. Se realizaron varios repiques a las colonias que presentaron las características de bacilos. Estas cepas fueron llamadas cepas 2019-I. Luego se volvió a aislar estas en cajas de Petri con agar MRS y se sembró:

- Tres colonias aisladas con las muestras de las cajas de Petri anteriormente realizadas
- Una colonia del caldo MRS de la cepa anterior

Las nuevas cepas obtenidas fueron repicadas y se nombraron como cepas 2019-II.

**Figura 10.** Preparación de colonias del segundo ensayo



**Fuente.** Autoras (2020)

### 5.7.3. Preparación de la cepa para el segundo ensayo

Se hizo una selección de las cepas para la preparación del inóculo para esto fue necesario realizar tinción de Gram y de la identificación morfológica se escogieron las siguientes cepas:

- Un microorganismo aerobio obtenido en caldo
- Un microorganismo 2019 II que creció en medio anaerobio
- Cuatro nuevas cepas obtenidas en 2019 II

- Cinco cepas obtenidas en 2019 I

Todas las cepas aquí mencionadas fueron sembradas en cajas de Petri con agar MRS como se muestra en el anexo 1, e incubadas a 37°C en aerobiosis y una vez se cumplieron las 48 h se realizaron tinciones de Gram cuyos resultados se muestran en la tabla 9. Las cepas fueron caracterizadas por morfología y se escogieron las dos mejores para realizar el inóculo del segundo ensayo.

#### **5.7.4. Tipo de bacteria y purificación de la cepa**

Se realizaron varios repiques en caldo y agar MRS en aerobiosis y anaerobiosis se incubaron a 35°C por 48 h, posterior a esto se hicieron tinciones de Gram y la identificación por morfología de los microorganismos. De las cepas purificadas se escogieron tres cepas que fueron enviadas al laboratorio de microbiología de la Universidad de Santander (UDES) en donde se realizó la identificación bioquímica de *Lactobacillus*.

#### **5.7.5. Preparación del segundo diseño de experimentos**

Se realizó un diseño de experimentos por quintuplicado con tres variables independientes que correspondían a los tratamientos de la pulpa de café y se tomó como variable de respuesta a las unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos. Para la preparación del segundo diseño de experimento se tomaron las condiciones de fermentación óptimas del primer ensayo y se optimizaron usando tres estrategias de pretratamiento para la pulpa de café: hidrólisis ácida (pulpa con tratamiento), deshidratación parcial (pulpa seca) y pulpa sin tratamiento.

#### **5.7.6. Pretratamiento de la pulpa**

Todas las estrategias evaluadas para mejorar el crecimiento de microorganismos usando la pulpa como sustrato, fueron preparadas al 15% y se observan en la figura 11.

**5.7.6.1. Pulpa de café con hidrólisis ácida.** Se prepararon 500 mL de pulpa al 15% con hidrólisis ácida para ello se adicionó 0.18 M  $H_2SO_4$  a la pulpa y se calentaron durante 30 min a 121°C, esto para liberar los azúcares, luego se neutralizó adicionando NaOH al 25% (p/p).

**5.7.6.2. Pulpa de café con deshidratación parcial.** Se prepararon 500 mL de pulpa al 15% de café que previamente fue secada en el horno a una temperatura de 60°C durante 24 h.

**5.7.6.3. Pulpa de café sin tratamiento.** Se prepararon 500 mL de pulpa de café licuándola y llevándola a 15% con agua destilada y agua peptonada.

**Figura 11.** Estrategias de la Pulpa de Café



**Fuente.** Autoras (2020)

#### **5.7.7. Preparación del inóculo con caldo MRS**

La preparación del inóculo se hizo mediante el método directo de inoculación a partir de una colonia aislada. Para esto se tuvieron en cuenta los resultados de la preparación de la cepa para el segundo ensayo y a partir del comportamiento de las mejores cepas se preparó el inóculo.

Se prepararon dos frascos con caldo MRS cada uno con 100 mL. Para preparar el inóculo se tomó cada frasco y se le sembró la cepa 1 y 9 a cada uno respectivamente como se observa en la figura 12.

**Figura 12.** Preparación de Inóculo con Caldo MRS



**Fuente.** Autoras (2020)

Los inóculos fueron incubados a 35°C por 48 h. Con estos dos medios de cultivo (cepa 1 y 9) se trabajó para preparar el inóculo al 2.50%.



### 5.7.8. Preparación del inóculo al 2.50%

Para la preparación del inóculo al 2.50% se debió ajustar a la densidad óptica de 0.125 en escala equivalente 0.5 estándar de McFarland a una concentración de  $1.50 \times 10^8$  UFC/mL dado por (Jurado et al., 2014).

Para la preparación del inóculo al 2.50% fue necesario:

1. Se tomaron 9 mL de solución salina para ajustar la densidad óptica y se agregó a un tubo de ensayo, luego se tomó 1.00 mL de muestra. Esta muestra correspondía a la cepa 1 o 9 preparada en la sección 5.7.7, está fue la primera dilución. Para preparar la segunda dilución lo que se hizo fue agregar 9 mL de solución salina al tubo de ensayo y 1.00 mL de la primera dilución.
2. Estas diluciones de la cepa 1 y 9 al 1:100 fueron medidas en el espectrofotómetro a 625 nm, este fue utilizado para ajustar la densidad del inóculo, por medio de este se estableció que la dilución 1:100 fue la más óptima para la preparación del inóculo al 2.50% puesto que en el caso de la dilución 1:100 de la cepa 1 se obtuvo un valor de 0.138 de densidad óptica y en la cepa 9 se tuvo un valor de 0.154 de densidad óptica siendo estos dos valores los que más se asemejaban a la densidad óptica de 0.125 en escala equivalente a  $1.50 \times 10^8$  UFC/mL escogida de (Jurado et al., 2014).
3. La cantidad de inóculo al 2.50% agregada en cada reactor artesanal fue de:

25 mL de muestra  $\rightarrow$  100%

Cantidad de inóculo  $\rightarrow$  2.50% inóculo

$$X = \frac{25 \text{ mL} * 2.50\%}{100\%} = 0.625 \text{ mL de inóculo}$$

La cantidad de inóculo agregado en cada reactor artesanal fue de 0.625 mL.

4. Por cada cepa se prepararon 15 muestras para un total de 30 muestras, por lo que se debió preparar 9.50 mL de inóculo al 2.5% para cada cepa.
5. Se prepararon 2 inóculos al 2.50% uno con la cepa 1 y otro con la cepa 9 en ambos se agregó 9 mL de agua peptonada en cada reactor artesanal y 0.50 mL de cepa 1 y 9 respectivamente en cada tarro, se agregaron 0.50 mL dado que tomando este valor se realiza la dilución 1:100 directamente que es la que presento valores más cercanos en densidad óptica 0.125 escogida de (Jurado et al., 2014).

### 5.7.9. Preparación de la optimización de las condiciones segundo ensayo

Para la preparación del segundo ensayo se prepararon las muestras con las siguientes condiciones 15% pulpa, 2.50% inóculo y se puso a incubar a 60 h. Se prepararon 30 muestras del segundo ensayo de la siguiente manera:

- 10 reactores para la pulpa sin tratamiento (PN)
- 10 reactores para la pulpa con hidrólisis ácida o con tratamiento (PT)
- 10 reactores para la pulpa con deshidratación parcial o seca (PS)

Por cada tratamiento se realizaron 10 muestras, 5 muestras se incubaron a 35°C con la cepa 1 y 5 muestras se incubaron a la misma temperatura con la cepa 9. Dado que se tenían 3 tratamientos, en total fueron 15 muestras con cepa 1 y 15 con cepa 9 para un total de 30 muestras. Teniendo en cuenta lo anterior en la tabla 6 se observan los nombres asignados a las muestras:

**Tabla 6.** Nombres de las muestras del segundo ensayo

Estrategia de la pulpa / Cepa	1	9
Pulpa sin tratamiento (PN)	C1PN-1	C9PN-1
	C1PN-2	C9PN-2
	C1PN-3	C9PN-3
	C1PN-4	C9PN-4
	C1PN-5	C9PN-5
Pulpa con hidrólisis ácida (PT)	C1PT-1	C9PT-1
	C1PT-2	C9PT-2
	C1PT-3	C9PT-3
	C1PT-4	C9PT-4
	C1PT-5	C9PT-5
Pulpa seca (PS)	C1PNS-1	C9PS-1
	C1PS-2	C9PS-2
	C1PS-3	C9PS-3
	C1PS-4	C9PS-4
	C1PS-5	C9PS-5

**Fuente.** Autoras (2020)

Para la preparación de cada muestra se realizó el siguiente proceso:

1. Se llenaron 10 reactores artesanales con pulpa sin tratamiento (PN), Pulpa seca (PS) y pulpa con hidrólisis ácida (PT) cada uno con 25 mL de pulpa. Y se taparon.
2. A cada muestra se le adicionaron 0.625 mL de inóculo de la cepa 1 o 9 dependiendo de la muestra.
3. De estas muestras preparadas se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una para realizar las diluciones y conteo en placa. Por último, fueron tapadas y selladas con cinta teflón, para así ser incubadas a 35°C durante 60 h como se observan en la figura 13.

**Figura 13.** Muestras con Pulpa de Café



**Fuente.** Autoras (2020)

#### **5.7.10. Diluciones y conteo en placa**

Se realizó por medio de la técnica de vertido en placa y extensión en placa que consiste en la suspensión de células microbianas diluidas antes de que se realice la siembra de la misma en la caja de Petri. Se realizó de la siguiente manera:

Se siguió el mismo procedimiento explicado previamente en la sección 5.7.8 para asegurar una densidad óptica de 0.125. En la figura 14 se muestra parte del procedimiento realizado:

**Figura 14.** Preparación de diluciones



**Fuente.** Autoras (2020)

De la dilución 1:100 de cada muestra se tomó 1.00 mL y se vertió en una caja de Petri directamente sobre la superficie como se observa en las figuras 15.

**Figura 15.** Dilución de muestras para conteo en placa (a y b)



(a)



(b)

**Fuente.** Autoras (2020)

Se calentó el agar Plate Count a baño maría y cuando este se volvió líquido se esperó hasta que estuviera a una temperatura más baja sin dejar que se solidificara, cuando esto pasó se agregó el agar a las cajas de Petri que contenían la dilución de la muestra, mezclando así el agar con la dilución que posteriormente permitió el crecimiento de las colonias. Cuando la dilución se mezcló completamente con el agar se rotuló según la tabla 6.

Las cajas de Petri que se muestran en la figura 16 se colocaron en la incubadora junto con las muestras de los reactores artesanales a 35°C y se dejaron durante 60 h, pasado este tiempo se sacaron y se hizo medición de las colonias.

**Figura 16.** Diluciones sembradas con muestra



**Fuente.** Autoras (2020)

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. ENSAYOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

#### **6.1.1. Obtención de la primera muestra y ensilaje del primer ensayo**

En la figura 17 se observan las muestras que fueron sembradas en agar sangre y MacConkey.

**Figura 17.** Muestras con Agar Sangre y MacConkey



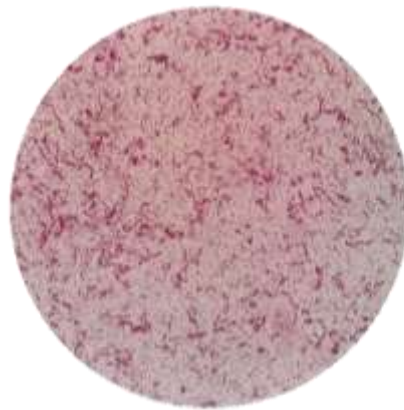
**Fuente.** Autoras (2020)

De las muestras que fueron sembradas en agar sangre y agar MacConkey se obtuvieron colonias bacilos Gram positivos, cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos, pero no se obtuvo la identificación bioquímica solo se realizó morfológicamente por coloración de Gram.

#### **6.1.2. Siembra de colonias aisladas del medio de cultivo modificado**

En la siembra de colonias aisladas del medio de cultivo modificado se obtuvieron cepas de bacilos gram positivas observadas en la figura 18 que presentaron bordes regulares, forma alargada, no esporuladas e inmóviles cumpliendo así con las características morfológicas propias para este tipo de bacterias (Ramírez Muñoz, 2010). Dentro de las bacterias gram positivas que cumplieron con las características morfológicas previamente mencionadas se encuentran las especies de *Lactobacillus* que pueden ser homofermentativas o heterofermentativas dependiendo de si producen solo ácido láctico o una mezcla entre ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol y/o acetato (Carrillo y Audisio, 2007).

**Figura 18.** Cepa de Bacilos Gram Positivos



**Fuente.** Autoras (2020)

#### **6.1.3. Prueba de catalasa y oxidasa**

Se consideran como bacterias ácido lácticas aquellas cuyo resultado de catalasa y oxidasa sea negativo (Ramírez Muñoz, 2010). Las colonias no presentaron ningún viraje de color en la prueba de oxidasa por lo que se determinó que su reacción fue negativa y en la prueba de la catalasa no hubo producción de gas al adicionar el peróxido de hidrógeno, es decir no se observó burbujeo por adición del reactivo,

por lo que su reacción fue negativa también. De esta manera se identificaron las colonias utilizadas para el primer ensayo de fermentación, dado que esta prueba permitió identificar las bacterias que correspondían al tipo *Lactobacillus*.

Cabe resaltar que la catalasa es una enzima desintoxicante esto quiere decir que la función que lleva a cabo es la de eliminar sustancias que se producen durante el metabolismo bacteriano y que son tóxicas para las bacterias, esta prueba es una de las principales que se le debe realizar a los microorganismos recién aislados esto se hace con la finalidad de poder realizar una identificación definitiva del microorganismo. Se usa principalmente para distinguir a las familias *Staphylococaceae* y *Micrococaceae* estas pertenecen a la familia catalasa-positiva *Streptococaceae*, al igual que el género tipo *Bacillus* que corresponde a la catalasa positiva y que se distingue del género *Clostridium* que da prueba negativa frente a la misma prueba (Gil, 2019).

Una característica importante de los *Lactobacillus* que producen ácido láctico es que tienen la ausencia de una catalasa hémica; esto sucede en todos los géneros, por ello se les asigna el nombre de pseudocatalasas esto provoca que este tipo de bacterias no descompongan el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua por lo cual la prueba de la catalasa es negativa (Ortiz Balderas, 2006).

Una vez se comprobó que la catalasa y oxidasa fueron negativas se pudo afirmar que la cepa aislada anteriormente corresponde al tipo *Lactobacillus* puesto que también cumple con las características morfológicas descritas en la bibliografía (Carrillo y Audisio, 2007).

## **6.2. FERMENTACIÓN EN PRESENCIA DE PULPA DE CAFÉ: PRIMER DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

Para el primer ensayo se prepararon 155 muestras preparadas según la sección 5.6 de este documento, una vez culminadas los tiempos de fermentación se procedió a realizar el conteo de colonias el cual se debió realizar con cada una de las 155 muestras que se encontraban en cajas de Petri, este procedimiento se hizo por medio de recuento con cuenta colonias y al obtener la cantidad de bacterias se registraba el valor en una hoja Excel. En el anexo 7 se encuentran los datos completos de cantidad de *Lactobacillus* del primer ensayo.

Para realizar un mejor análisis global del experimento, teniendo en cuenta que hubo variabilidad en los resultados se decidió utilizar el histograma de frecuencias.

### **6.2.1. Histograma del primer diseño de experimentos**

En la tabla 7 se muestra la tabla de frecuencias utilizada para realizar el histograma.

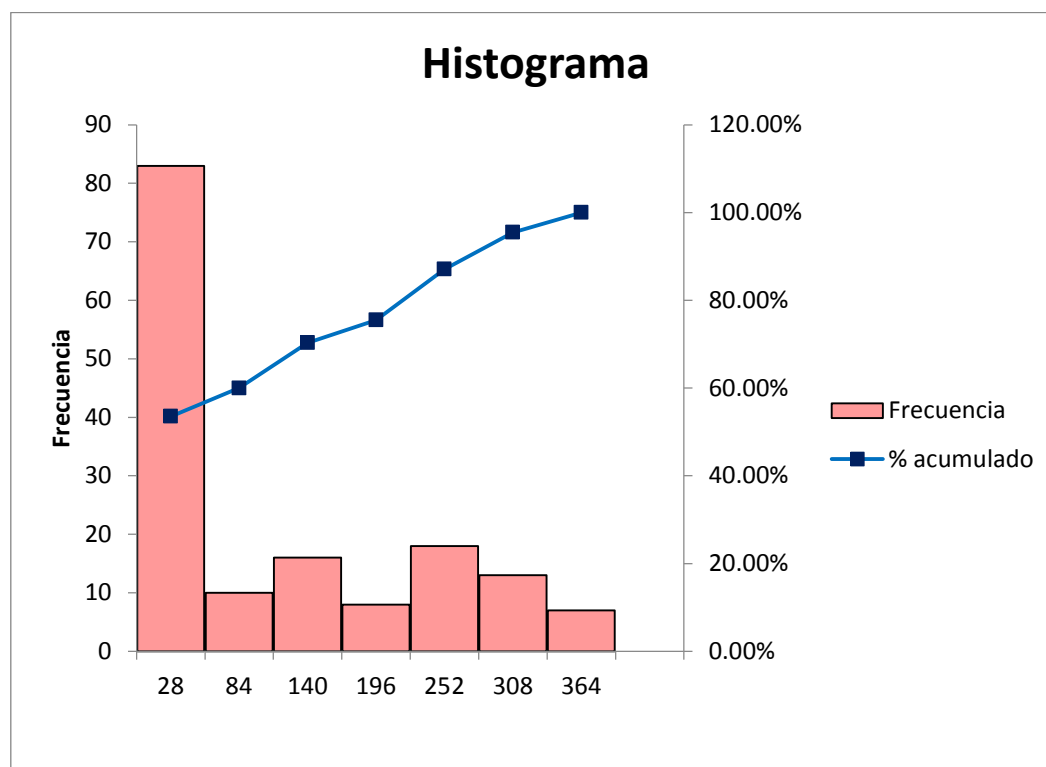
**Tabla 7.** Distribución de frecuencias

Límite inferior	Límite superior	Marca de clase	Frecuencia	Frecuencia Acumulada	% Frecuencia acumulada	% acumulado
Unidad Cantidad de <i>Lactobacillus</i> (UFC/mL 10 <sup>9</sup> )						
0,001	56,00086	28	83	83	54%	53,55%
56,00086	112,0007	84	10	93	6%	60,00%
112,0007	168,0006	140	16	109	10%	70,32%
168,0006	224,0004	196	8	117	5%	75,48%
224,0004	280,0003	252	18	135	12%	87,10%
280,0003	336,0001	308	13	148	8%	95,48%
336,0001	392	364	7	155	5%	100,00%

**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 19 se observa la representación gráfica de los 155 datos obtenidos en el primer diseño de experimentos.

**Figura 19.** Histograma del primer ensayo





Fuente. Autoras (2020)

En la figura 19 se observa que entre la mayor frecuencia fue la que presentó la menor cantidad de UFC/mL de *Lactobacillus* con 83 datos, 54% de frecuencia acumulada y un promedio de  $28 \times 10^9$  UFC/mL presentándose la mayoría de estos a las 96 horas tiempo en el cual la mayoría de *Lactobacillus* se encontraban muertas. Por otro lado, a las 60 horas para las condiciones de inóculo al 1 % - 15 % pulpa y 2.50 % inóculo- 10 % pulpa se presentó la segunda mayor frecuencia con 18 datos, una frecuencia acumulada de 12% y con valores promedio de  $252 \times 10^9$  UFC/mL. Los resultados que presentaron mayores cantidades de *Lactobacillus* con valores superiores a  $336 \times 10^9$  UFC/mL solamente mostraron el 5% de frecuencia acumulada con 7 datos siendo estos los que menos cantidad de veces se repitieron a pesar de ser los que más se esperaba obtener, estos datos se encontraron para el 15% pulpa de pulpa a las 24 horas para concentraciones de inóculo del 1 % y 4 %.

### 6.2.2. Análisis y discusión de resultados primer diseño de experimentos

Para corroborar los resultados previamente presentados en el histograma de frecuencias se decidió hacer un promedio en cada repetición que se muestran en la tabla 8 que se muestra a continuación

**Tabla 8.** Promedio y desviación estándar de las condiciones del primer ensayo

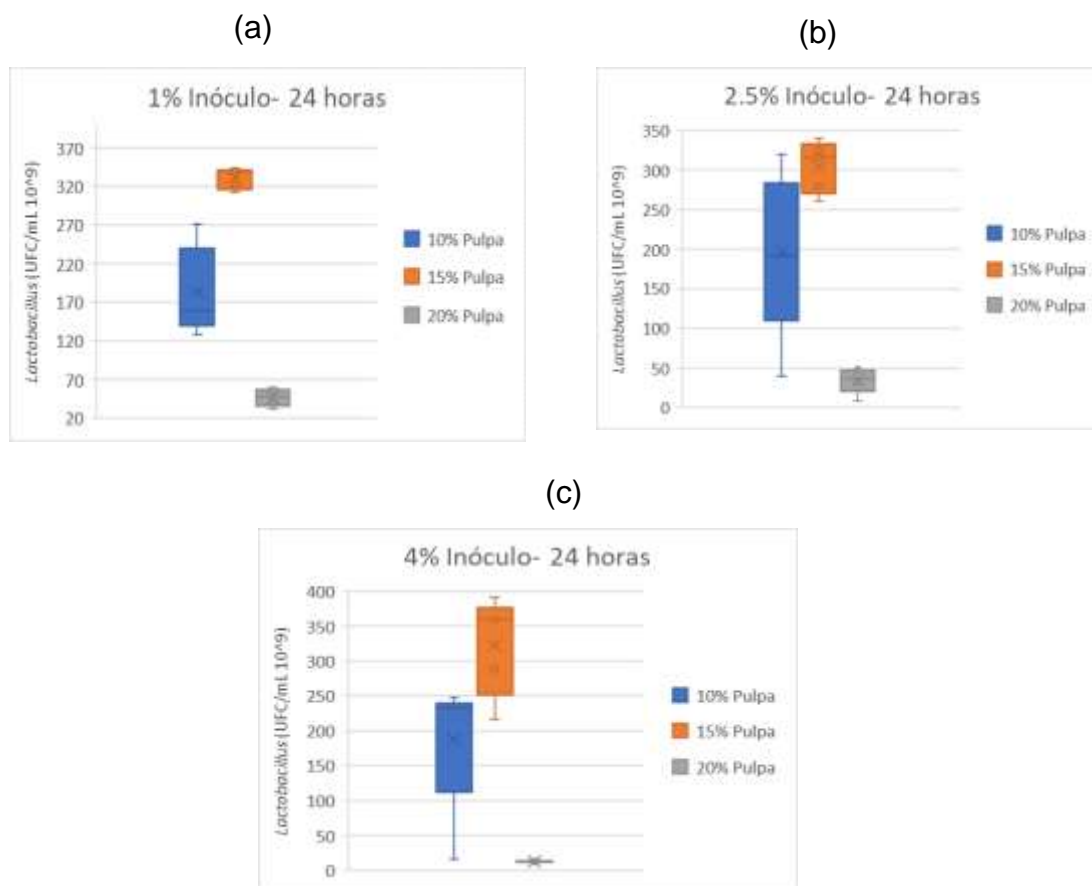
PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR PRIMER ENSAYO							
UNIDAD		UFC/mL 10^9					
10%Pulpa		1%		2.5%		4%	
		Inóculo					
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
24	Horas	184,00	57,13	196,00	103,31	187,20	96,76
60		216,80	47,53	60,00	30,85	44,00	12,96
96		0,02	0,00	0,03	0,02	0,02	0,02
15%Pulpa		1%		2.5%		4%	
		Inóculo					
		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
24	Horas	331,20	14,25	304,20	33,14	323,20	71,02
60		101,40	21,84	231,60	64,81	118,00	13,56
96		5,64	12,50	0,06	0,01	0,08	0,02
20%Pulpa		1%		2.5%		4%	
		Inóculo					

		Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
24	Horas	47,20	11,45	34,60	15,99	12,80	1,79
60		11,20	7,69	38,40	10,81	8,00	2,83
96		0,01	0,002	0,002	0,001	0,004	0,003

**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 20 se observa la caja de bigotes a las 24 h del primer ensayo.

**Figura 20.** Cajas de bigotes a las 24 h del primer ensayo (a, b y c)



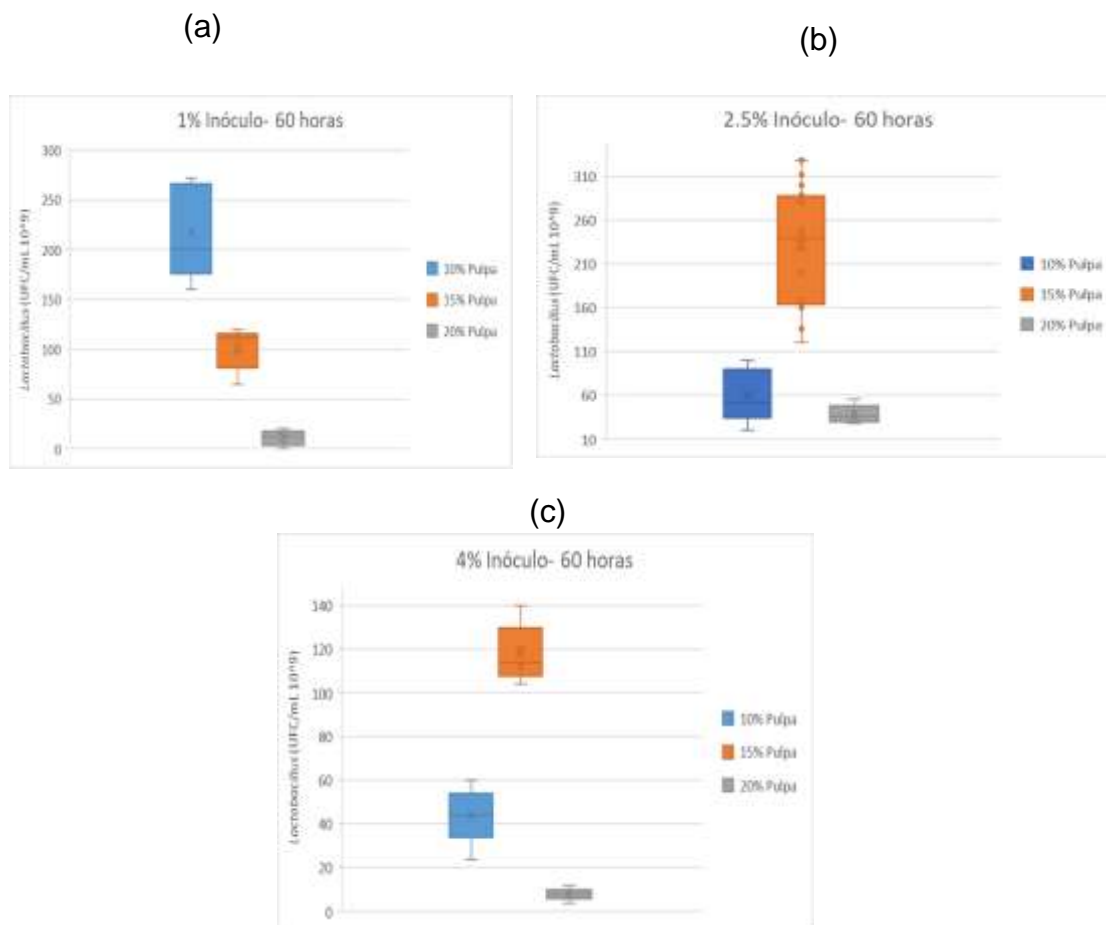
**Fuente.** Autoras (2020)

De la figura 20 se observa que a las 24 h la pulpa al 15% presentó las mayores cantidades de *Lactobacillus* y para el inóculo al 4% se presentó el mayor valor de

*Lactobacillus* que fue de  $392 \times 10^9$  UFC/mL. La pulpa al 20% es la que presentó los resultados más bajos en todos los casos.

En la figura 21 se observa las cajas de bigotes a las 60 h del primer ensayo.

**Figura 21.** Cajas de bigotes a las 60 h primer diseño

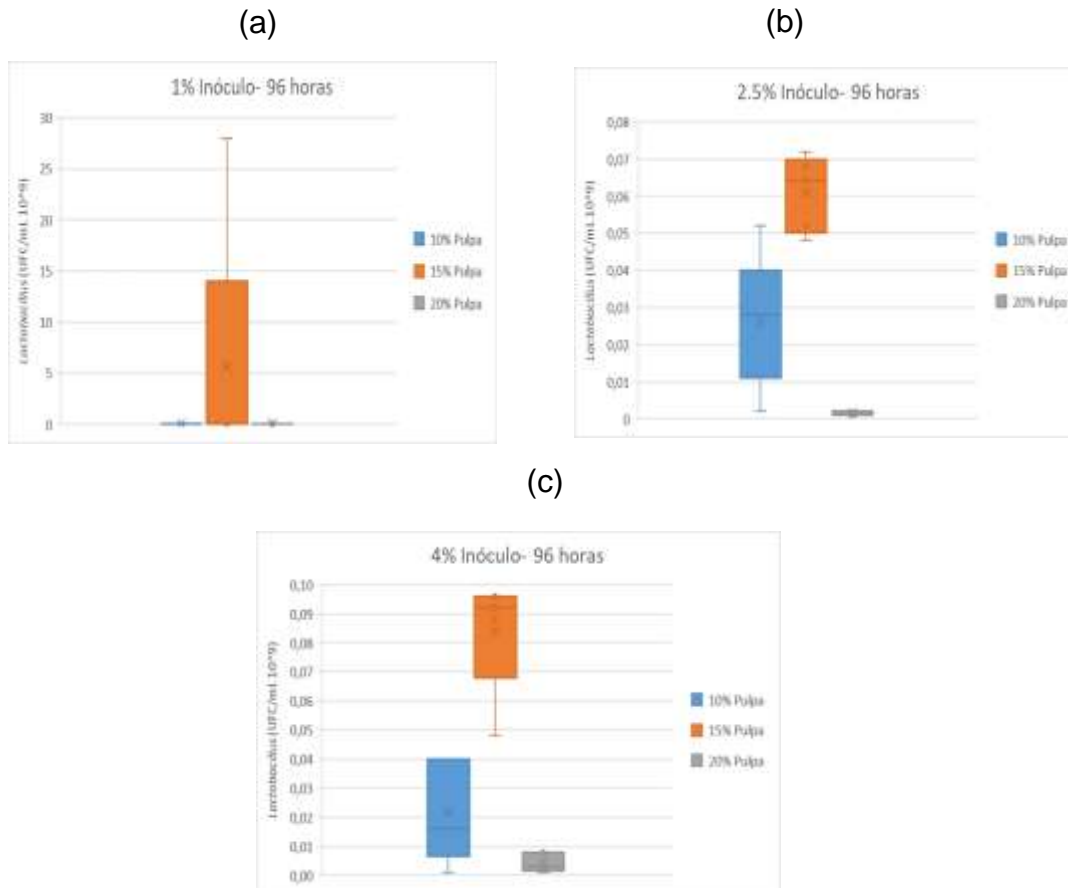


**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 21 se puede observar que para el inóculo al 2.5% y 4 % el mejor crecimiento de bacterias se presentó para la pulpa al 15%, sin embargo, el inóculo al 2.50 % para la pulpa al 15% presentó mayores cantidades de UFC/mL. Para el inóculo al 1% las mayores cantidades de UFC/mL fueron para la pulpa al 10%, al igual que en la figura anterior la pulpa al 20% presenta las cantidades más pequeñas de UFC/mL de *Lactobacillus*.

En la figura 22 se observa la caja de bigotes a las 96 h del primer diseño.

**Figura 22.** Cajas de bigotes a las 96 h primer diseño



**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 22 se observa que la cantidad de bacterias para el inóculo al 1% en las pulpas al 10% y 20% no se presentó cantidades muy significativas respecto a la pulpa al 15% que, aunque para este caso no presentó valores muy grandes siendo menores a  $30 \times 10^9$  UFC/mL supero a los dos porcentajes de pulpas anteriores siendo la cantidad más grande de bacterias a las 96 h. En lo que respecta al inóculo al 2.5% y 4% se muestra que la pulpa al 15% presentó las mayores cantidades de UFC/mL, sin embargo, cabe resaltar que estas no superan el  $1 \times 10^9$  UFC/mL, lo cual se explica en que la mayoría de las bacterias en este tiempo se encuentran muertas.

Para establecer las condiciones de fermentación óptimas para el crecimiento de *Lactobacillus* se usó un diseño de experimentos del tipo factorial  $3 \times 3$  como se

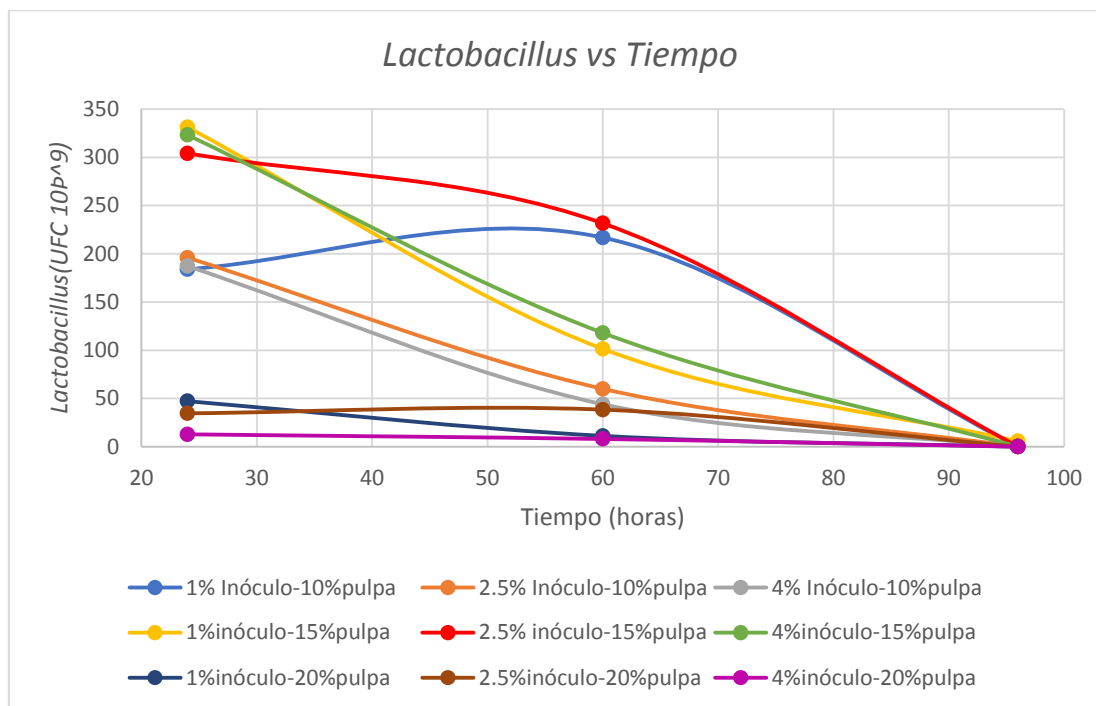
especificó en el diseño de experimentos y por medio del software Statgraphics se pudieron establecer 155 muestras aleatorias como combinación de tres factores independientes: tiempo, % pulpa de café y % inóculo.

Jurado y Jarrín (2015) encontraron que a las 14 h y 24 min las bacterias tipo *Lactobacillus* ya habían llegado a la fase estacionaria (Jurado y Jarrín, 2015). Por lo que se afirma que a las 24 h en todos los casos que se muestran en la figura 19 las bacterias no están ni en fase de latencia ni en fase exponencial, sino que ya se encuentra en fase estacionaria o de decrecimiento.

Si bien las fases de latencia y crecimiento exponencial son importantes para el crecimiento de microorganismos de acuerdo con Plata et al. (2013) se comienzan a observar mejores cantidades de ácido láctico después de las 20 h como se reportó previamente en bibliografía en donde se alcanzan valores de entre 4 g/L y 6 g/L (Plata et al., 2013). Con base en este trabajo se escogieron los tiempos de fermentación tomando el primer dato a las 24 h ya que se conoce que la fase estacionaria inicia aproximadamente a las 15 h de fermentación, pero los tiempos más importantes de producción de ácido láctico suelen aparecer después de las 20 h, el segundo valor corresponde a las 60 h que fue el máximo tiempo al que llegaron los investigadores previamente mencionados y se quiso saber que pasaba después por lo que se tomó como último valor las 96 h.

Los resultados obtenidos del primer ensayo de fermentación se observan en la figura 23 en un tiempo en el que el crecimiento del *Lactobacillus* ha pasado la fase de latencia y la fase exponencial encontrándose en la fase de decrecimiento de acuerdo a lo observado en un gráfico normal de crecimiento bacteriano.

**Figura 23.** Presencia de *Lactobacillus* en diferentes tiempos de fermentación



**Fuente.** Autoras (2020)

El decrecimiento de la cantidad de microorganismos vivos que se presenta en la figura 20 es más notorio en los tratamientos que tienen 20 % de pulpa y es que de las 24 h a las 60 h más del 50 % de las bacterias se encontraban muertas. Además, para este porcentaje de pulpa se observaron los valores más bajos de *Lactobacillus* siendo inferiores a  $50 \times 10^9$  UFC/mL, esto puede estar relacionado con los compuestos polifenólicos asociados a la pulpa que se conoce tienen un efecto adverso sobre el crecimiento de microorganismos en general (Martínez et al., 2019).

Para los valores obtenidos con 10% de pulpa se encontró un comportamiento no esperado correspondiente al 1% de inóculo, pero para el 2.50% y 4% de inóculo como es esperable se observó una fase de decrecimiento lo que hace referencia a que las bacterias se están muriendo, presentando un porcentaje de muertes de 69.39% y 76.50% de las 24 a las 60h.

El sustrato de pulpa al 15% es donde se muestran las mayores cantidades de UFC de *Lactobacillus*. Para los inóculos al 1% y 4% los porcentajes de muertes fueron de 69.38% y 63.49%. Sin embargo, para el inóculo al 2.50% se muestra que el decrecimiento de bacterias fue mucho menor presentando solo el 23.87% de muertes. Todos los porcentajes de muertes corresponden al tiempo de 24 h a 60 h.

Se considera el óptimo de pulpa como 15% al presentar los valores más altos en cantidad de microorganismos siendo de  $331.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 1%,  $304.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 2.50% y  $323.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 4% a las 24 horas. Sin embargo, para el óptimo de inóculo se descartaron como óptimos el 1% y 4% dado que entre 24 h y 60 h el porcentaje de muertes de bacterias fue superior al 50 %. Es por esto que el óptimo escogido fue el de 2.50% de inóculo dado que, aunque no presentó la mayor cantidad de bacterias siendo de  $231.60 \times 10^9$  UFC/mL a las 60 h mostró un porcentaje de muertes de 23.87% de las 24 h a las 60h, siendo el más bajo en todas las condiciones y mostrando la mejor resistencia y adaptación de las bacterias tipo *Lactobacillus* a las condiciones del medio de producción ensayado. Por último, para tomar el óptimo de tiempo se escogieron las 60 h dado que la mayor cantidad de ácido láctico producido por las bacterias se presentó en este lapso de tiempo siendo de 0.1514 mg/L, demostrando que no necesariamente la mayor cantidad de bacterias es la que produce la mayor cantidad de ácido láctico.

Plata et al. (2013) encontraron que después de las primeras 12 h de fermentación, la producción de ácido láctico se ve afectada por el crecimiento del microorganismo y el alto consumo del sustrato logrando estabilizarse a las 48 h de fermentación con una producción total de 18 g/L y alcanzando la mayor producción de ácido láctico a las 50 h con un valor de 17.72 g/L (Plata et al., 2013).

Finalmente se decidió que las condiciones óptimas de crecimiento se presentan con 15% de pulpa, 2.50% de inóculo a las 60 h de fermentación dado que el porcentaje de muerte ocurre de una manera más lenta y resistente hasta ese tiempo teniendo en cuenta todas las condiciones. Se descartaron las 24 h dado que, aunque fue el mayor crecimiento de bacterias estas no produjeron la mayor cantidad de ácido láctico siendo de 0.1188 mg/L y a las 96 horas el 99.80% en promedio de las bacterias en todas las condiciones ya se encontraban muertas, además según Plata et al. (2013) la mayor producción de ácido láctico se presenta después de las 50 h.

En el presente trabajo, se obtuvo en el primer ensayo valores de  $331.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 1%,  $304.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 2.50% y  $323.20 \times 10^9$  UFC/mL para el inóculo al 4% con un porcentaje de pulpa de café correspondiente al 15% en un tiempo de 24 h el cual se tomó como valor inicial. Si se compara con Jurado y Jarrín (2015) ellos evaluaron el crecimiento del *Lactobacillus lactis* a dos temperaturas 38°C y 45°C en donde encontraron que a las 14 h y 24 min la bacteria llegó a la fase estacionaria en medio MRS con valores de crecimiento de  $1.70 \times 10^{13}$  UFC/mL y  $1.40 \times 10^{13}$  UFC/mL (Jurado y Jarrín, 2015).

Se observó que en comparación con Jurado y Jarrín (2015) la cantidad de bacterias fue menor, esto puede estar relacionado con el hecho de que en esta

investigación se evaluaron cepas extraídas de pulpa de café, mientras que en el trabajo de Jurado y Jarrín (2015) se tomó la bacteria *Lactobacillus lactis* con condiciones optimizadas de crecimiento. Es por ello que sus cantidades de bacterias fueron mayores.

Según El Fondo Nacional del Café, los factores de fermentación influyen en gran medida ya que en particular la velocidad y los compuestos formados en la fermentación de café dependen principalmente de la calidad del sustrato, madurez y sanidad del fruto que influyen en la composición química y microbiológica de los granos despulpados, además de los factores ambientales (FNC, 2014).

### **6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN: SEGUNDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

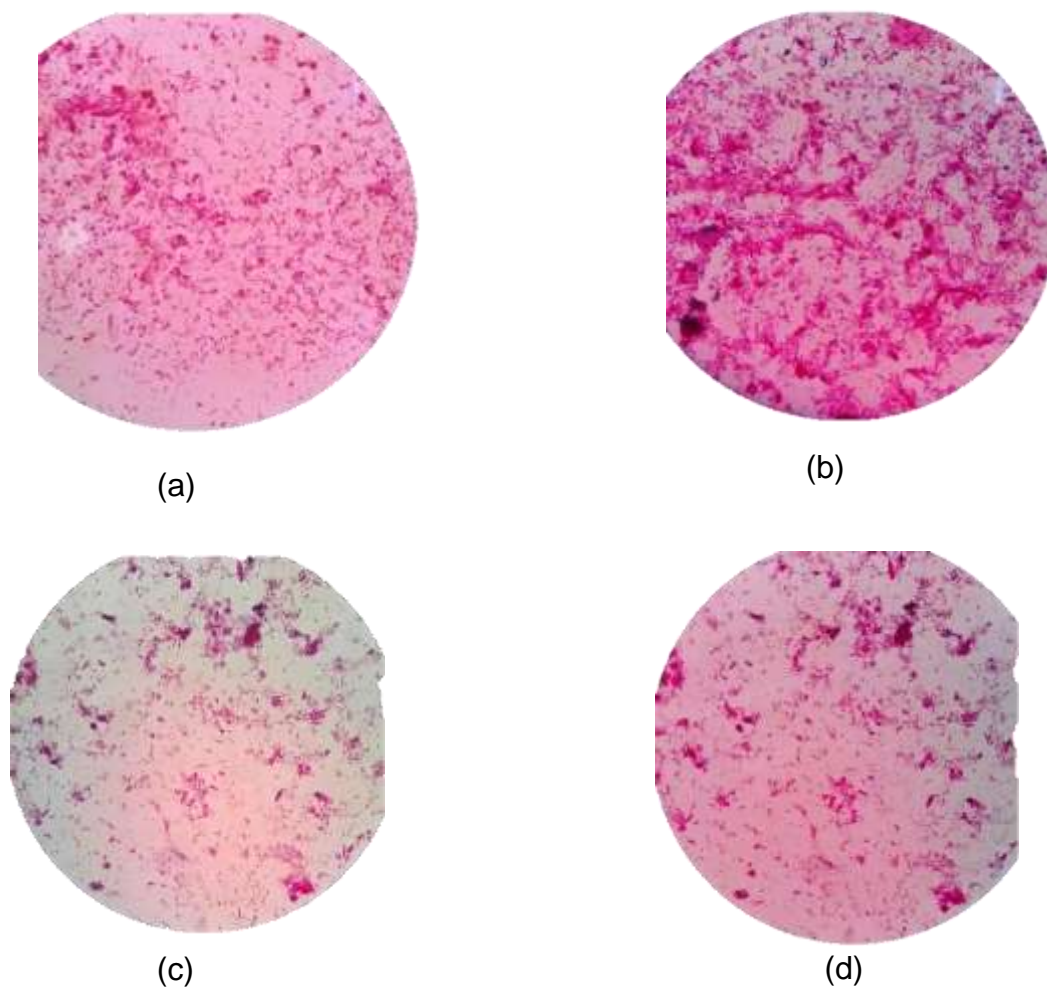
Para el primer ensayo se prepararon 30 muestras preparadas según la sección 5.7 de este documento en donde se aplicaron 3 tratamientos diferentes pulpa sin tratamiento, pulpa con hidrólisis ácida y pulpa con deshidratación parcial aplicando las condiciones óptimas explicadas en la sección 6.2, una vez culminadas las 60 horas se procedió a realizar el conteo de colonias el cual se debió realizar con cada una de las 30 muestras que se encontraban en cajas de Petri, este procedimiento se hizo por medio de recuento con cuenta colonias y al obtener la cantidad de bacterias se registraba el valor en una hoja Excel. En el anexo 8 se encuentran los datos completos de cantidad de *Lactobacillus* del segundo ensayo.

#### **6.3.1. Preparación de colonias del ensilaje segundo ensayo**

Según la figura 24 las bacterias corresponden al tipo *Lactobacillus* las cuales pertenecen a la familia Gram positivas, como se ha observado estas bacterias son no esporuladas, tienden a ser largas y metabolizan un amplio rango de azúcares para producir principalmente ácido láctico. Las bacterias tipo *Lactobacillus* necesitan de medios complejos para poder tener un óptimo crecimiento y crecen normalmente en temperaturas que están entre los 30 °C y 40 °C. Entre los géneros que son altamente productores de ácido láctico se encuentran las familias *Streptococaceae* y *Lactobacillaceae*. Se observó además la presencia de levaduras que afectan el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus* (Waldir et al., 2007).



**Figura 24.** Bacterias tipo Lactobacillus (a, b, c y d)



**Fuente.** Autoras (2020)

### **6.3.2. Preparación de la cepa para el segundo ensayo**

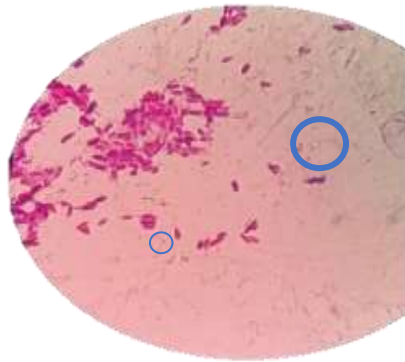
En el anexo 1 se pueden observar las muestras escogidas para la siembra de las cepas 1,2,3,4,5,6,7,8 y 9. En la tabla 9 que se muestra a continuación se pueden ver los resultados obtenidos para las bacterias observadas en la tinción de Gram:

**Tabla 9.** Resultados de las tinciones de Gram de las cepas 1-9

Cepa	Tinción	Observación
------	---------	-------------

---

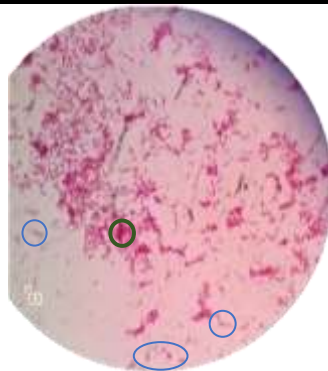
1



Se observó la presencia de bacilos gram positivos delimitados con color azul.

---

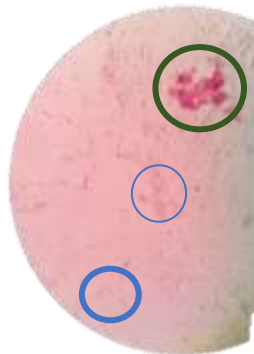
2



Se observó en las partes delimitadas con azul bacilos gram positivos y encerrado de color verde una levadura.

---

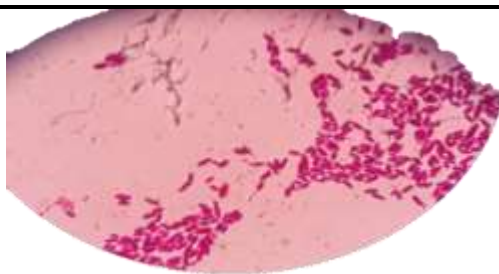
3



Se presentó poca presencia de bacilos gram positivos los cuales fueron de tamaño pequeño como se observa en las delimitaciones de color azul y en la parte superior demarcada en color verde se presentaron levaduras.

---

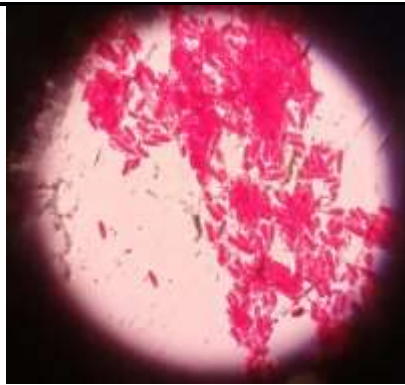
4



No se evidenció la presencia de bacilos gram positivos.

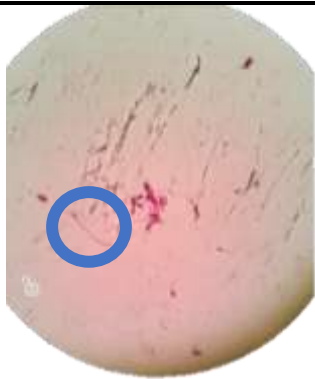
---

5



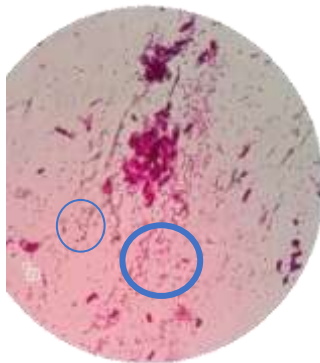
No se evidenció la presencia de bacilos gram positivos.

6



Delimitado de azul se observó un bacilo gram positivo alargado de gran tamaño.

7



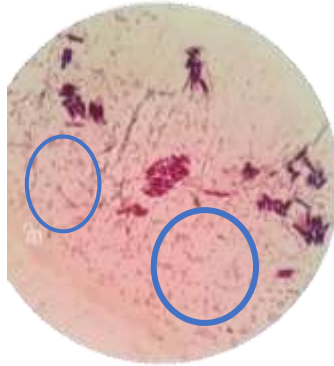
Se presentó una gran cantidad de bacilos gram positivos como se observa en los círculos de color azul.

8



Se observó gran presencia de bacilos gram positivos (círculo azul) y presencia de levaduras (círculo verde).

9




En la cepa 9 se presentaron los mejores resultados de bacilos gram positivos, mostrándose una colonia fuerte y grande como se observa en las delimitaciones de color azul.






**Fuente.** Autoras (2020)





De las características morfológicas observadas en la tabla 9 y teniendo en cuenta las tinciones de Gram se observó la presencia de Bacilos gram positivos en 7 de las 9 cepas exceptuando a las cepas 4 y 5. Así mismo la cepa 9 presenta la mayor cantidad de colonias mostrándose *Bacilos* gram positivos fuertes y grandes. En algunas de las cepas se encontró la presencia de levaduras.

Los resultados de las siembras en agar MRS con azul de metileno en aerobiosis y anaerobiosis de las cepas 1,2,3,4,5,6,7,8 y 9 se pueden visualizar en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados en las siembras de Agar MRS con Azul de Metileno.

Nombre	Cepa	Fotografía de la cepa	Descripción
Aerobia	1-2		La cepa 1 presentó un buen crecimiento de la colonia mientras que la cepa 2 se mostró débil y en poca cantidad.

Anaerobia	1-2		La cepa 1 presentó buen crecimiento y gran cantidad de bacilos mientras que la cepa 2 mostró poco crecimiento de bacilos.
Aerobia	3-4		La cepa 3 presentó buenos resultados de bacilos gram positivos mientras que la cepa 4 no creció.
Anaerobia	3-4		La cepa 3 mostró buen comportamiento de bacilos gram positivos mientras que la cepa 4 no creció.
Aerobia	5-6		La cepa 5 no creció mientras que en la cepa 6 se observó la presencia de una levadura.
Anaerobia	5-6		La cepa 5 no creció mientras que en la cepa 6 se encontró una levadura.

Aerobia	7-8		La cepa 7 se contaminó con la levadura de la cepa 8.
Anaerobia	7-8		La cepa 7 presentó buen crecimiento de bacilos gram positivos mientras que la cepa 8 no creció.
Aerobia	9		La cepa 9 presentó buen crecimiento de Bacilos gram positivos.
Anaerobia	9		La cepa 9 presentó buen crecimiento de bacilos gram positivos.

**Fuente.** Autoras (2020)

El mejor comportamiento y crecimiento de *Bacilos* gram positivos se presentó para las cepas 1 y 9 en anaerobiosis en donde se observó por inspección visual la mayor cantidad de bacterias. Para realizar el inóculo del segundo ensayo fueron escogidas las cepas 1 y 9 que mostraron el mejor comportamiento durante el proceso de purificación de la cepa. De esta manera se buscó obtener mejores resultados en el segundo ensayo de fermentación, garantizando dos cepas con presencia de *Bacilos* gram positivos de buen crecimiento y adaptabilidad que inocularían de una manera más eficiente las muestras. En la cepa 6 y 8 se mostró la presencia de levaduras, la cepa 7 fue contaminada y por lo tanto descartada para ser inóculo del segundo ensayo.

Las cepas 1 y 9 tomadas para realizar el inóculo fueron sometidas a condiciones de anaerobiosis dado que su crecimiento es mayor en estos ambientes. Tanto el primer ensayo de fermentación como el segundo, se realizaron en condiciones anaerobias en las que las bacterias crecieron en ausencia de oxígeno lo que


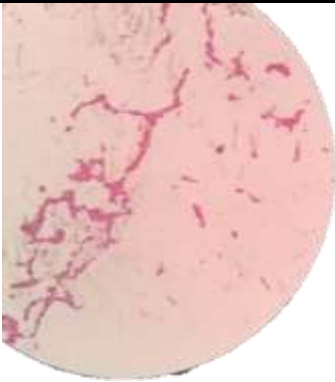

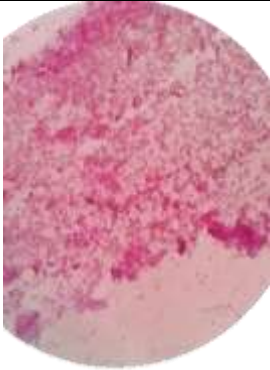


facilitó la adaptación de las mismas en el medio de crecimiento, puesto que este tipo de bacterias cuentan con un metabolismo que genera energía a partir de sustancias sin necesitar oxígeno del aire en el proceso a diferencia de las bacterias aerobias que necesitan de un ambiente que contenga O<sub>2</sub> para poder existir y desarrollarse (Corrales et al., 2015).

### 6.3.3. Tipo de bacteria y purificación de la cepa

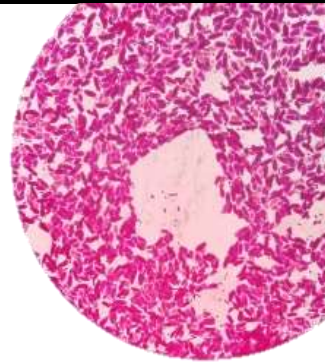
Para la purificación de la cepa se realizaron varios repiques que se muestran en los anexos del 2 al 6, estos fueron de gran importancia para obtener una cepa pura. Teniendo en cuenta los anexos mencionados en la tabla 11 se muestran las cepas que mostraron mejor comportamiento.

**Tabla 11.** Tinción de gram de las mejores cepas

Nombre	Cepa	Tinción de Gram	Descripción
Rensilaje 2 aerobio			Cepa pura de bacilos gram positivos.
R3 aerobio y R5			Bacilos gram positivos iniciales.

---

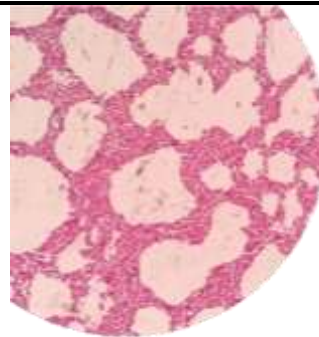
Rensilaje  
1 aerobio



Levadura  
con  
bacilos gram  
positivos.

---

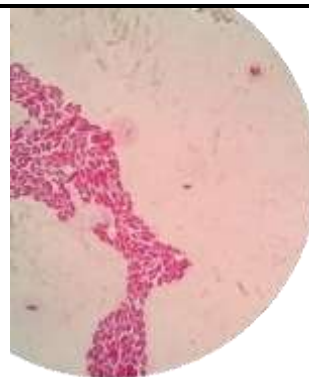
R9  
Aerobia



Bacilos  
gram  
positivos  
*Corynobac-  
terium*.

---

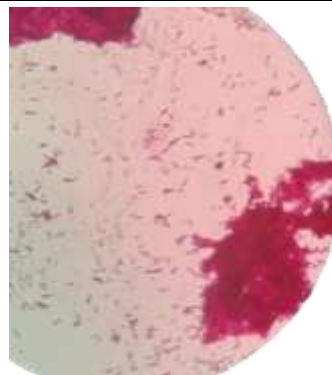
Cepa 6 y  
8



Levadura.

---


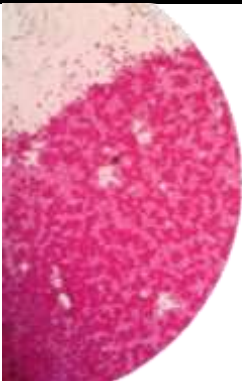

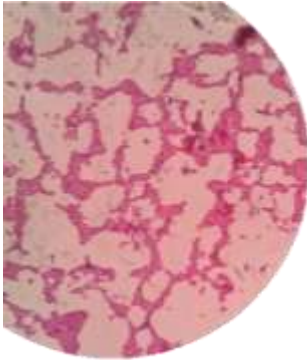
R1  
anaerobio



Bacilos  
gram  
positivos.

---



Repique R ensilaje 2 anaerobio			<i>Lactobaci- llus.</i>
Rcaldo ensilaje 1 y 2 anaerobio			Bacilos gram positivos.

**Fuente.** Autoras (2020)

De la tabla 11 fueron escogidas las cepas R3 y R5 aerobia, R repique R ensilaje 2 anaerobia y R ensilaje 2 aerobio, las cuales fueron enviadas a la Universidad de Santander (UDES) en donde se determinó a que género de bacteria pertenecían. En las tinciones realizadas a las cepas se observó la presencia de bacterias tipo *Lactobacillus* gram positivos y *Corynebacterium* agrupadas.

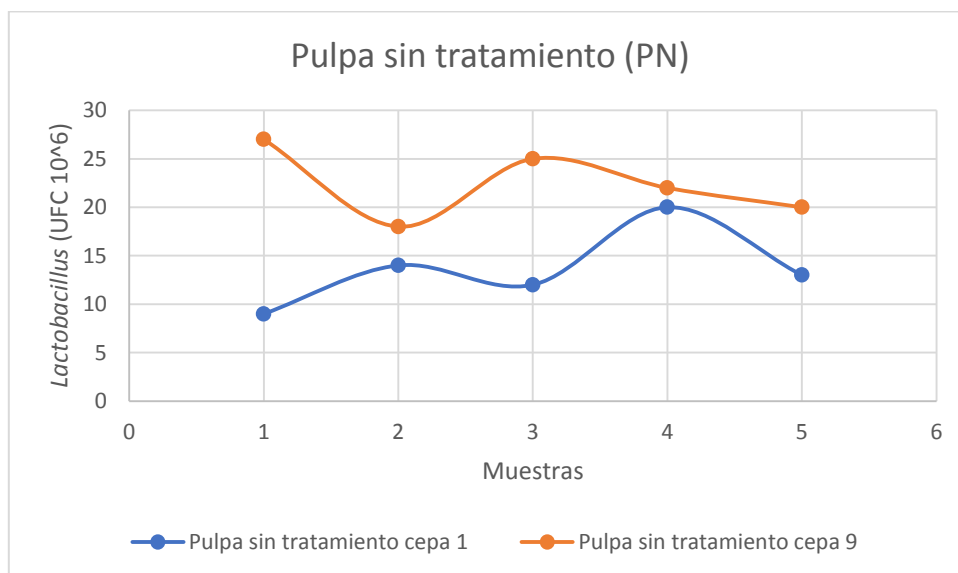
Para el caso de las cepas 6 y 8 se observaron levaduras que limitaron el período de vida y crecimiento de los *Lactobacillus*. Por esta razón fue imposible aislar las bacterias que se encontraban en estas cepas a pesar de estar sembradas en agar MRS, puesto que la levadura limitó el desarrollo de las dos cepas testeadas.

#### **6.3.4. Resultados segundo ensayo de fermentación**

A continuación, se muestran los resultados del segundo ensayo de fermentación realizado de acuerdo con los valores óptimos del primer ensayo correspondiente a 15% de pulpa, 2.50% de inóculo y un tiempo de 60 h tomados como base para hacer una nueva optimización de acuerdo con las muestras que se han mencionado previamente en la tabla 9.

En la figura 25 se observa el crecimiento de *Lactobacillus* (UFC/mL) en la pulpa sin tratamiento para las 5 muestras:

**Figura 25** Crecimiento de *Lactobacillus* en la pulpa sin tratamiento.



**Fuente.** Autoras (2020)

En el caso de la pulpa sin tratamiento se presentó la mayor cantidad de bacterias para la cepa 9 siendo de  $27 \times 10^6$  UFC/mL. Sin embargo, esta cepa fue la que mostró la menor producción de ácido láctico correspondiente a un valor promedio de 0.10 mg/L. Para la cepa 1 se encontró la menor cantidad de bacterias con un valor de  $9 \times 10^6$  UFC/mL que produjeron un promedio de 0.16 mg/L de ácido láctico.

En la tabla 12 se muestran los resultados estadísticos para la pulpa sin tratamiento. Las medias para la cepa 1 y 9 fueron de  $13.60 \times 10^6$  UFC/mL y  $22.40 \times 10^6$  UFC/mL con coeficientes de asimetría de Fisher de 0.68 para la cepa 1 y 0.09 para la cepa 9 presentando una asimetría positiva en la que se alargaron sus datos a valores mayores que la media. En ambas cepas la distribución de los datos fue platicúrtica con valores de curtosis de 2.51 y 1.59 para la cepa 1 y 9 respectivamente. La cepa 1 presentó mayor dispersión en sus resultados puesto que su desviación estándar fue de  $3.61 \times 10^6$  UFC/mL siendo mayor respecto a la cepa 9 cuya desviación estándar fue de  $3.26 \times 10^6$  UFC/mL, además, la cepa 1 presentó mayor dispersión de los datos puesto que su coeficiente de variación para la cepa fue de 26.55 % siendo también mayor respecto a la cepa 9 que tuvo 14.56 %.

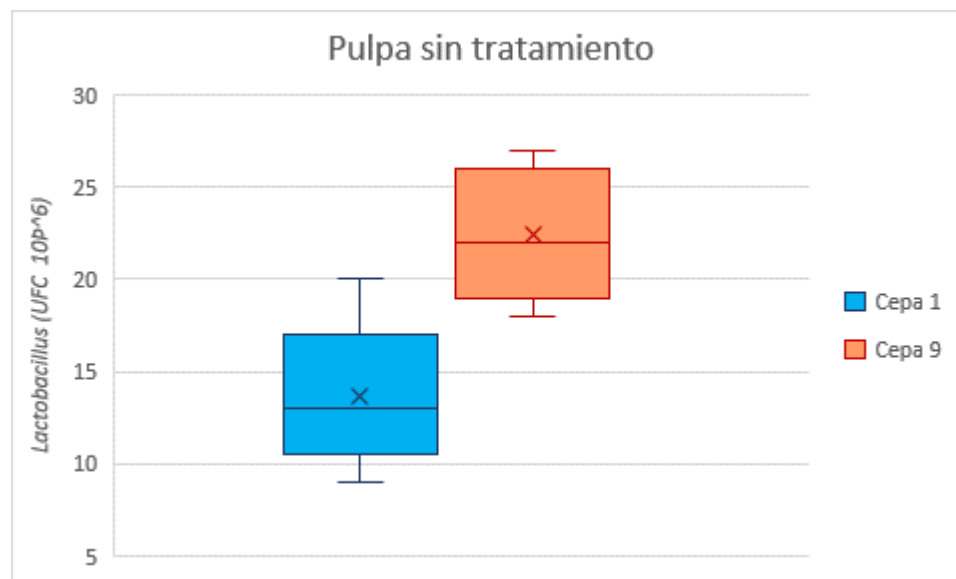
**Tabla 12.** Resultados estadísticos de la pulpa sin tratamiento

<b>PULPA SIN TRATAMIENTO</b>			
<b>Cepa 1</b>		<b>Cepa 9</b>	
Unidad	UFC/mL <i>Lactobacillus</i> 10 <sup>6</sup>		
Media	13,60	Media	22,40
Mediana	13,00	Mediana	22,00
Varianza de la muestra	13,04	Varianza de la muestra	10,64
Desviación estándar	3,61	Desviación estándar	3,26
Coeficiente de Variación	26,55%	Coeficiente de Variación	14,56%
Curtosis	2,51	Curtosis	1,59
Coeficiente de asimetría de Fisher	0,68	Coeficiente de asimetría de Fisher	0,09
Coeficiente de asimetría de Bowley	0,16	Coeficiente de asimetría de Bowley	0,02
Mínimo	9	Mínimo	18
Máximo	20	Máximo	27

**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 26 se presentan dos cajas en las que se compararon las cepas 1 y 9. Las distribuciones corresponden a la variable cantidad de *Lactobacillus* y cada serie corresponde a una categoría de la variable cepa. La mediana fue de  $13 \times 10^6$  UFC/mL para la cepa 1 y de  $22 \times 10^6$  UFC/mL para la cepa 9, ambas cepas presentaron una asimetría positiva con un coeficiente de asimetría de Bowley de 0.16 para la cepa 1 y 0.02 para la cepa 9, ya que la distancia de la mediana de ambas cepas al tercer cuartil fue mayor que al primero, sin embargo, se observa que para la cepa 9 la distribución se acerca más a una distribución simétrica, puesto que el primer y tercer cuartil están a la misma distancia de la mediana por lo que su valor de coeficiente de Bowley fue más cercano a 0. En la figura 26 se observa que el crecimiento de *Lactobacillus* de la cepa 9 fue mayor respecto a la cepa 1 por lo que se infiere que la cepa 9 obtuvo mejores resultados.

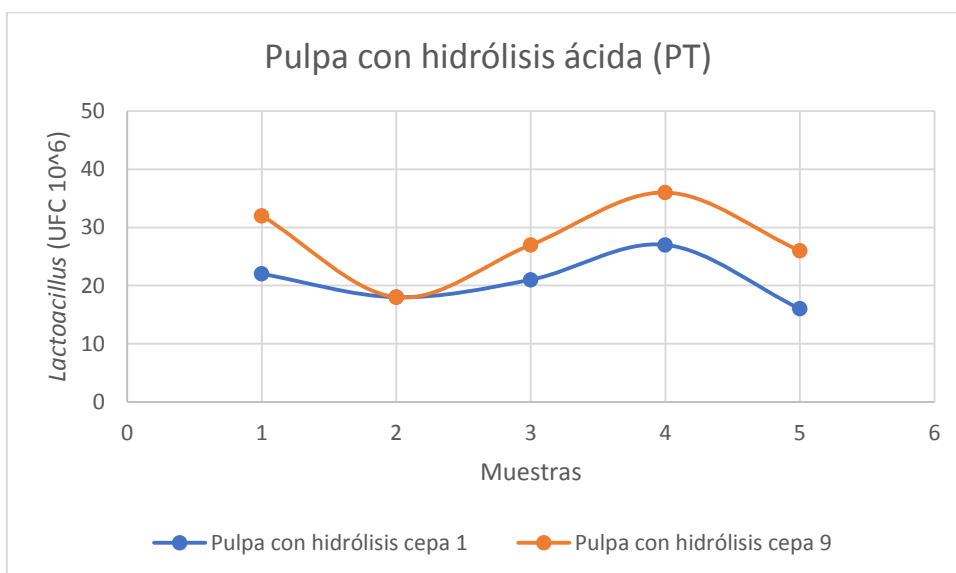
**Figura 26.** Caja de bigotes pulpa sin tratamiento cepa 1 y 9



**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 27 se observa el crecimiento de *Lactobacillus* (UFC/mL) en la pulpa con hidrólisis ácida para las 5 muestras:

**Figura 27.** Crecimiento de *Lactobacillus* en la pulpa con hidrólisis ácida



**Fuente.** Autoras (2020)

Para la pulpa con hidrólisis ácida se encontró que la menor cantidad de bacterias corresponden a la cepa 1 con un valor de  $16 \times 10^6$  UFC/mL, esta cepa produjo una cantidad promedio de 0.14 mg/L de ácido láctico. En el caso de la cepa 9 se evidenció la mayor cantidad de bacterias con un valor de  $38 \times 10^6$  UFC/mL, para esta cepa se produjo un promedio de 0.11 mg/L de ácido láctico.

En la tabla 13 se observan los resultados estadísticos para la pulpa con hidrólisis ácida en donde la media fue de  $20.80 \times 10^6$  UFC/mL para la cepa 1 con un coeficiente de asimetría de Fisher de 0.40 por lo que presentó una asimetría positiva y una media de  $27.80 \times 10^6$  UFC/mL para la cepa 9 con un coeficiente de Fisher de -0.29 presentando una asimetría negativa en la que se alargaron los datos a valores menores que la media. La cepa 9 presentó mayor dispersión de los datos con una desviación estándar de  $6.08 \times 10^6$  UFC/mL y un coeficiente de variación de 21.87 % respecto a la cepa 1 que mostró una desviación estándar de  $3.76 \times 10^6$  UFC/mL y un coeficiente de variación de 18.09 % y en ambas cepas la curtosis presentó una distribución platycúrtica con valores de 2.07 para la cepa 1 y 2.06 para la cepa 9.

**Tabla 13.** Resultados estadísticos de la pulpa con hidrólisis ácida

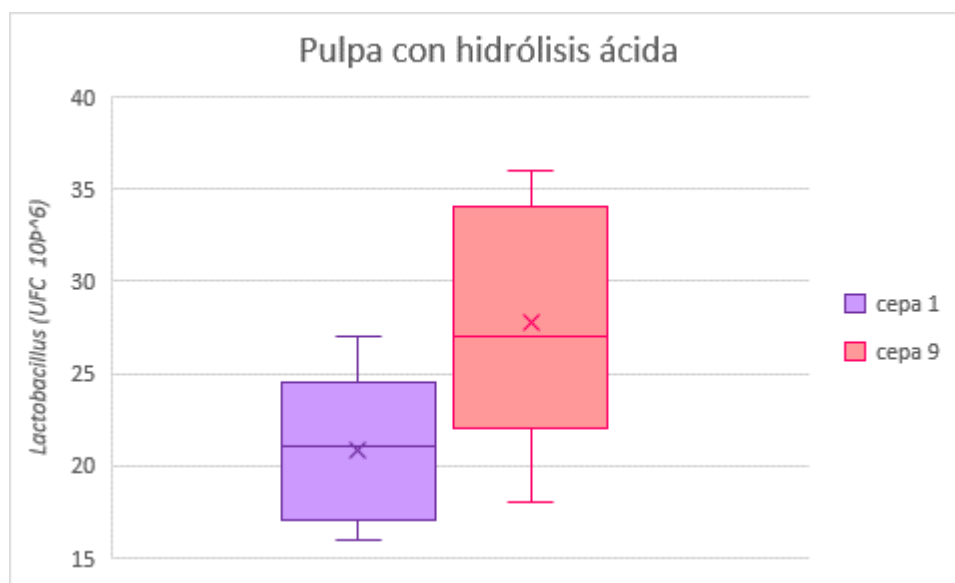
<b>PULPA CON HIDRÓLISIS ÁCIDA</b>			
<b>Cepa 1</b>		<b>Cepa 9</b>	
Unidad	UFC/mL <i>Lactobacillus</i> $10^6$		
Media	20,80	Media	27,80
Mediana	21,00	Mediana	27,00
Varianza de la muestra	14,16	Varianza de la muestra	36,96
Desviación estándar	3,76	Desviación estándar	6,08
Coeficiente de Variación	18,09%	Coeficiente de Variación	21,87%
Curtosis	2,07	Curtosis	2,06
Coeficiente de asimetría de Fisher	0,40	Coeficiente de asimetría de Fisher	-0,29
Coeficiente de asimetría de Bowley	0,13	Coeficiente de asimetría de Bowley	0

Mínimo	16	Mínimo	18
Máximo	27	Máximo	36

**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 28 se observa la caja de bigotes para la cepa 1 y 9 de la pulpa con hidrólisis ácida en donde la mediana fue de  $21 \times 10^6$  UFC/mL y  $27 \times 10^6$  UFC/mL respectivamente. Para la cepa 1 se obtuvo un coeficiente de asimetría de Bowley de 0.13 por lo que se presentó una asimetría positiva, ya que la distancia de la mediana al tercer cuartil es mayor que al primero y el coeficiente de Bowley para la cepa 9 fue de 0 por lo que presentó simetría en el cual la distancia de la mediana al primer cuartil fue igual que la distancia de la mediana al tercer cuartil. En la figura 28 se aprecia que el crecimiento de *Lactobacillus* es mayor en la cepa 9 puesto que se presentaron los mejores resultados entre las dos cepas.

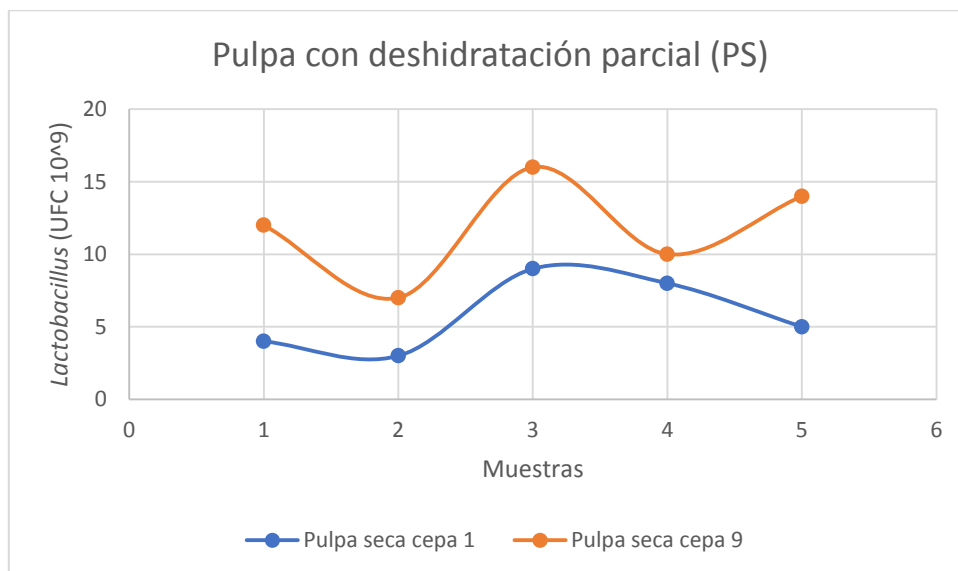
**Figura 28.** Caja de bigotes pulpa con hidrólisis ácida cepa 1 y 9



**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 29 se observa el crecimiento de *Lactobacillus* (UFC/mL) en la pulpa con deshidratación parcial para las 5 muestras:

**Figura 29.** Crecimiento de *Lactobacillus* en la pulpa con deshidratación parcial



**Fuente.** Autoras (2020)

De los resultados obtenidos de la pulpa con deshidratación parcial la menor cantidad de bacterias corresponden a la cepa 1 siendo de  $3 \times 10^9$  UFC/mL, a su vez esta cepa mostró valores promedio de producción de ácido láctico de 0.16 mg/L. En el caso de la cepa 9 se observó el mayor número de bacterias correspondientes a  $16 \times 10^9$  UFC/mL y esta presentó una producción promedio de 0,19 mg/L de ácido láctico.

En la tabla 14 se muestran los resultados estadísticos de la pulpa con deshidratación parcial en donde se observó que la media para las cepas 1 fue de  $5.80 \times 10^9$  UFC/mL con un coeficiente de asimetría de Fisher de 0.24 presentando una asimetría positiva y para la cepa 9 una media de  $11.80 \times 10^9$  UFC/mL con un coeficiente de Fisher de -0.21 con una asimetría negativa. Aunque la cepa 9 mostró una mayor desviación estándar siendo de  $3.12 \times 10^9$  UFC/mL con respecto a la cepa 1 que obtuvo una desviación estándar de  $0.40 \times 10^9$  UFC/mL, la mayor dispersión de los resultados se presentó en la cepa 1 puesto que aunque en ambas cepas la curtosis presentó una distribución platicúrtica, la cepa 1 mostro un valor de 1.40 por lo que se dice que la concentración de los datos fue menor y presentando una forma más achatada respecto a la cepa 9 que presento un valor de 1.84, además de esto la cepa 1 presentó mayor dispersión de los datos con un coeficiente de variación de 39.92% respecto a la cepa 9 que mostró 26.48%.

**Tabla 14.** Resultados estadísticos pulpa con deshidratación parcial

---

**PULPA CON DESHIDRATACIÓN PARCIAL**

---

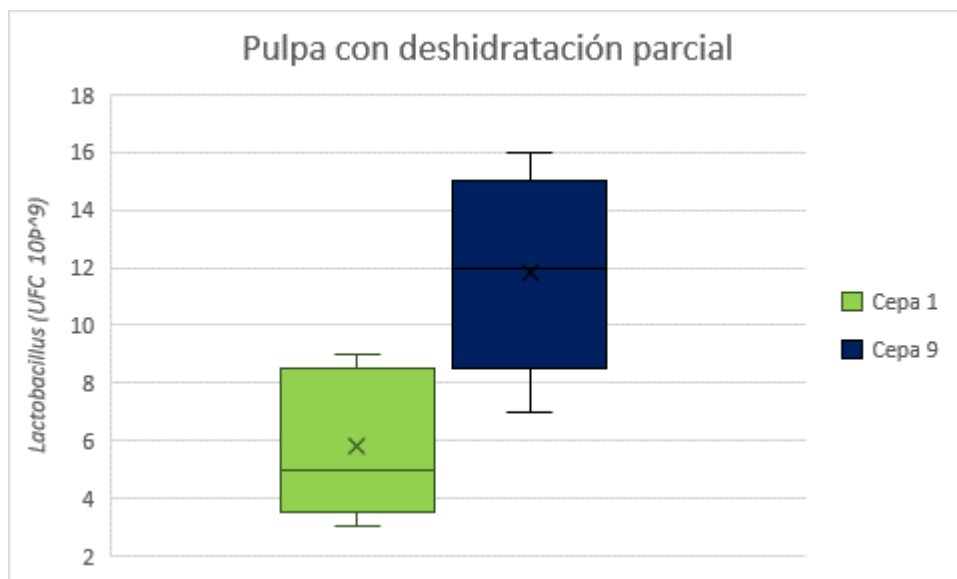
<b>Cepa 1</b>		<b>Cepa 9</b>	
Unidad	UFC/mL <i>Lactobacillus</i> 10 <sup>9</sup>		
Media	5,80	Media	11,80
Mediana	5,00	Mediana	12,00
Varianza de la muestra	5,36	Varianza de la muestra	9,76
Desviación estándar	0,40	Desviación estándar	3,12
Coeficiente de Variación	39,92%	Coeficiente de Variación	26,48%
Curtosis	1,40	Curtosis	1,84
Coeficiente de asimetría de Fisher	0,24	Coeficiente de asimetría de Fisher	-0,21
Coeficiente de asimetría de Bowley	0,07	Coeficiente de asimetría de Bowley	-0,11
Mínimo	3	Mínimo	7
Máximo	9	Máximo	16

**Fuente.** Autoras (2020)

En la figura 30 se observa la caja de bigotes para la cepa 1 y 9 de la pulpa con deshidratación parcial. En esta se observa que la mediana para la cepa 1 fue de  $5.00 \times 10^9$  UFC/mL y la de la cepa 9 fue de  $12.00 \times 10^9$  UFC/mL. El coeficiente de Bowley fue de 0.07 para la cepa 1 presentando una asimetría positiva, ya que la distancia de la mediana al tercer cuartil es mayor que al primero y para la cepa 9 el coeficiente de Bowley fue de -0.11 en la que presentó una asimetría negativa, puesto que la distancia de la mediana al primer cuartil es mayor que al tercero. En la figura 30 se observó que la cepa 9 fue la que presentó mejores resultados en cuanto a el crecimiento de *Lactobacillus*.



**Figura 30.** Caja de bigotes pulpa con deshidratación parcial cepa 1 y 9



**Fuente.** Autoras (2020)

De las figuras 25, 27 y 29 se observó que en todos los tratamientos la mayor cantidad de bacterias se presentaron para la cepa 9, sin embargo, en el caso de la pulpa sin tratamiento y con hidrólisis ácida las bacterias de la cepa 1 produjeron mayor cantidad de ácido láctico en comparación con la cepa 9. Para estos dos tratamientos realizados sobre la pulpa, la cantidad de bacterias fue menor alcanzando un máximo de  $36 \times 10^6$  UFC/mL.

En el caso de la pulpa con deshidratación se presentaron las mayores cantidades de *Lactobacillus* de todo el segundo ensayo con cantidades de bacterias mayores a  $3 \times 10^9$  UFC/mL. Así mismo, en la cepa 9 se produjo la mayor cantidad promedio de ácido láctico correspondiente a una cantidad de 0.19 mg/L.

La pulpa de café deshidratada tiene un bajo contenido de humedad, siendo disminuido en el proceso de secado, lo que evita que crezcan y se reproduzcan las bacterias naturales que pueden estar presentes en la parte inicial del proceso (Chavarrías, 2013). Al disminuir la humedad de la pulpa en la deshidratación parcial se disminuyó la competencia de otras posibles bacterias que se encontraban inicialmente en la pulpa de café permitiéndole al inóculo tener una mejor resistencia y adaptación al no tener que competir por el alimento.

La pulpa de café tiene un alto contenido de humedad por lo que es propensa al ataque microbiano y a reacciones químicas de deterioro, sin embargo, al secar la pulpa se disminuyó la humedad de la misma lo que le confirió estabilidad a la supervivencia de los microorganismos de tipo *Lactobacillus* es por esto que en

este tratamiento se observó la mayor cantidad de bacterias (Torres et al., 2019). Al ensilar la pulpa deshidratada los *Lactobacillus* convirtieron los azúcares solubles en ácido láctico lo que ocasiono que el pH disminuyera hasta un nivel en el que las bacterias indeseables quedaran inhibidas lo cual facilitó la producción de ácido láctico permitiéndole así obtener mejores resultados al tratamiento de deshidratación parcial (Ramírez et al., 2011).

## CONCLUSIONES

- Los microorganismos aislados de la pulpa de café fueron identificados como *Lactobacillus* gram positivos gracias a las pruebas catalasa y oxidasa negativas, así como también debido a las observaciones morfológicas caracterizadas por microorganismos no esporulados, largos, de bordes regulares, alargados y no móviles.
- Las condiciones óptimas de fermentación para el crecimiento de *Lactobacillus* corresponden a 15% de pulpa, 2.50% de inóculo a las 60 h en donde se

encontró la mayor producción de ácido láctico siendo de 0.1514 mg/L. Además, en estas condiciones se presentó la cepa más resistente teniendo una cantidad de  $231.60 \times 10^9$  UFC/mL a las 60 h y un porcentaje de muertes de solo el 23.87% de las 24 h a las 60 h. Se demostró también que no necesariamente la mayor cantidad de bacterias produce la mayor cantidad de ácido láctico.

- En las estrategias implementadas se analizó que los mejores resultados se obtuvieron con el proceso de fermentación usando como sustrato la pulpa con deshidratación parcial de la cepa 9 que presentó una cantidad de bacterias superior a  $7 \times 10^9$  UFC/mL con una producción promedio de ácido láctico de 0.16 mg/L.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar todos los procedimientos dados en un laboratorio de microbiología en completa asepsia, de tal manera que se impida el ingreso de agentes externos que puedan contaminar las muestras.
- Las cepas repicadas y sembradas deben ser guardadas en la nevera con la finalidad de preservarlas de este modo se pueden seguir utilizando en caso de ser necesario, sin embargo, se debe tener en cuenta que estas tienen un

lapso seguro de trabajo de 20 días por lo que se recomienda utilizarlas antes de este tiempo.

- Se deben mantener tanto las cepas como los repiques en un sistema de crio preservación con el fin de mantenerlos congelados a temperaturas muy bajas, generalmente entre -20 °C en un congelador, de esta manera se pueden conservar en condiciones de vida suspendida por más tiempo, para así posteriormente llevar una colección de microorganismos (cerapio) y poder así continuar con la investigación.

## REFERENCIAS

Alcaldía municipal de Socorro, Santander. (2016-2019). *Plan de desarrollo municipal " Una Nueva Historia"*. Socorro: Alcaldía municipal de Socorro, Santander.

Alfaro, M. y Rodríguez, J.(1994). Impacto ambiental del procesamiento del café en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 18(2), 217-225.

- Álvarez, J., Hugh, S., Cuba, N. y Loza, M. (2011). Evaluación de un sistema de tratamiento de aguas residuales del prebeneficiado de (*Coffee arabica*) implementado en la comunidad Carmen Pampa provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2(1), 34-42.
- Arias Zabala, M., Henao Navarrete, L. y Castrillón Gutiérrez, Y. (2009). Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548. *DYNA*, 76(158), 147-153.
- Bejarano Cárdenas, N. (2016). *Determinantes y aportes de la caficultura al bienestar* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional.
- Cabeza Herrera, E. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. *ResearchGate*. 10.13140/2.1.2241.2169
- Capera Garzón, M. y Sánchez, H. (2018). *Diagnóstico del impacto ambiental de los residuos sólidos (pulpa y mucílago), del café generados por unidades productivas no certificadas en BPA en las veredas Tabacal y Betania del municipio de Pitalio departamento del Huila* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/20923>
- Carrillo, L. y Audisio, M. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos*. Jujuy.
- Castañeda, E. y Gallo, M. (2017). *Influencia del medio de crecimiento del Lactobacillus Delbrueckii subsp. Bulgaricus en la obtención de ácido láctico a partir del afrecho de café y cáscara de mandarina* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/8964>
- Cervantes Beyra, R., Castro Lizazo, I., Mesa Pérez, M., Ocampo Ramírez, A., Fernández Valdés, D. y Fernández Valdés, D. (2015). Efecto de la pulpa de *Coffea arabica* L. sobre la microflora de tres unidades de suelos. *Protección Veg*, 30(2), 115-122.

Chavarrías, M. (22 de Agosto de 2013). *El poder conservador del azúcar*. Consumer. <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/el-poder-conservador-del-azucar.html>

Corantioquia. (2016). *Manual de producción y consumo sostenible gestión del recurso hídrico*. Corantioquia.

Corrales , L., Antolinez Romero, D., Bohórquez Macías, J. y Corredor Vargas, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 3(24), 55-81.

DANE. (2020). *Boletín Técnico Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA)* .DANE.

Delgado,L. (26 de Febrero de 2017). *Preparación de la escalda de McFarland* . El baúl de lo minúsculo. <http://microlydiadt.blogspot.com/2017/02/preparacion-de-la-escala-de-mcfarland.html>

Escobar, L. Rojas, C., Giraldo G. y Padilla, L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche vacuno. *Rev.Invest.Univ.Quindío*, 42-49.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC). (2014). *Ensayos sobre economía cafetera No. 30*. Caficultura sostenible, moderna y competitiva.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC). (2019). *Informe de gestión 2019*. Fondo Nacional del Café.

García , C., Arrázola, G. y Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnología . *Temas agrarios*, 15(2), 9-26. <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>

Gil, M. (2019). *Prueba de la catalasa: fundamento, técnica y usos*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/>

González Arenas, J., Cubillos Buitrago, A., Chadid Hernández, M., Cubillos González, A., Arias Patiño, M., Zúñiga Avirama, E., Joubert, F., Pérez Vizcaíno, I. y Berrío Meneses, V. (2018). *Caracterización de las principales causas y agentes de la deforestación a nivel nacional período 2005-2015*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM., Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Programa ONU-REDD Colombia.

Hincapié Gómez, É. y Ramírez Ortiz, F. (2010). *Riesgo a la erosión en suelos de ladera de la zona cafetera*. Cenicafé.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. (2015). *NTC-ISO 14001: Sistema de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso*. ICONTEC.

Jurado, H. y Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Revista Biosalud*, 14(2), 49-62. 10.17151/biosa.2015.14.2.5

Jurado Gámez, H., Calpa Yamá, F. y Chaspuengal Tulcán, A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15-35.

Kamal , B. (23 de Junio de 2017). *La búsqueda de combustible, la ganadería, la soja , agotan los bosques*. nodal:Noticias de America Latina y el Caribe. <https://www.nodal.am/2017/06/la-busqueda-combustible-la-ganaderia-la-soja-agotan-los-bosques/>

Laboratorio Clínico y Biomédico. (2017). *Prácticas de Laboratorio: Microbiología*. Microbiologiabohio. <http://microbiologiabohio.blogspot.com/2018/01/escala-de-mcfarland.html>

Laboratorios Britania S.A. (2015). *M.R.S. Caldo* [Archivo PDF]. [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a28338a76b48.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28338a76b48.pdf)

León, D., Calderón, B., Martínez, A., Sánchez, E., Zulatto, A., Camacho, I., Arredondo, A. y Salgado, R. (2013). Formulación y optimización de un

medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación universitaria multidisciplinaria*, 133-144.

Martínez Alemán, S., Hernández Castillo, F., Aguilar González, C. y Rodríguez Herrera, R. (2019). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes y su actividad microbiana. *Investigación y Ciencia*, 27(77), 73-79.

Microbiologia671. (21 de Febrero de 2018). *Escala de McFarland*. Microbiología clínica. <https://microbiologia671.wordpress.com/2018/02/21/practica-escala-de-mcfarland/>

Moreno Clavijo, N. y Romero Jiménez, A. (2016). *Evaluación de diferentes métodos para la transformación de la pulpa de café en abono orgánico en fincas cafeteras* [Tesis de Maestría, Universidad de Manizales]. <http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/handle/6789/2620>

Novita, E. (2015). Biodegradability simulation of coffee wastewater using instant coffee. *ELSEVIER*, 9, 217-229. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.138>

Ortiz Balderas, M. (2006). *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo* [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10741/Identificacion%20bioquimica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pineda López, M., Ortiz Ceballos, G. y Sánchez Velásquez, L. (2005). Los cafetales y su papel en la captura de carbono: un servicio ambiental aún no valorado en Veracruz. *Madera y Bosques*, 11(2), 3-14.

Pino, F. (26 de 01 de 2017). *Las bacterias Gram positivas*. okdiario. <https://okdiario.com/curiosidades/bacterias-gram-positivas-697551>

Plata, A., Ramírez, S. y Riaño Luna, C. (2013). Valor agregado para el lacto suero de caprino proveniente de agroindustrias lácteas: ácido láctico como alternativa de descontaminación. *NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 11(9), 33-39.



Quiroz Marín, T. y Hincapié Gómez, E. (2007). Pérdidas de suelo por erosión en sistemas de producción de café con cultivos intercalados. *Cenicafé*, 58(3), 227-235.

Ramírez González, C. (2016). *La producción de café de alta calidad y los impactos generados en el ámbito social, ambiental y económico en Colombia* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/17517>

Ramírez Muñoz, F. (2010). *Aislamiento de bacterias Lactobacillus s.p y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonica in vitro* [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8624>

Ramírez Ramírez, J., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M., Ulloa, J. y Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*, 2(7), 1-16.

Rojas, A., Montaña, L. y Bastidas, M. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colomb. Quim.* 44(3), 5-10. 10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604

Rojas Sánchez, A., Hartman Ulloa, K. y Almonacid Márquez, R. (2012). El impacto de la producción de café sobre la biodiversidad, la transformación del paisaje y las especies exóticas invasoras. *Ambiente y Desarrollo*, 16(30), 93-104.

Rojas Vallejos, J. (2016). *Producción del hongo comestible Pleurotus ostreatus en pulpa de café* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/873>

Salmonella thypi. (3 de abril de 2012). *Técnica de siembra y tinciones para la morfología.* Salmonella thypi. <http://salmonellathypi.blogspot.com/2012/05/tecnica-de-siembra-y-tinciones-para-la.html>

Samayoa Toledo, A., Borrayo Herrera, B., Pérez Solares, A., Morataya Sazo, M. y Montenegro Álvarez, L. (2014). *Extracción de mucilago, azúcares y taninos de la pulpa de café y producción de ácido acético comercial a partir de las mieles del café* [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala].

Sanders. (1993). Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv Food Nutr Res*, 67- 130.

Sanz Cervera, S. (2011). *Prácticas de microbiología*. Universidad de La Rioja.

Seminario de Pruebas Bioquímicas . (s.f.). Obtenido de IDENTIFICACIÓN DE CEPA BACTERIANA : <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioPruebasBioquimicas.htm>

Serna Jiménez, J., Torres Valenzuela, L., Martínez Cortínez, K. y Hernández Sandoval, C. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *rev.Ion*, 31(1), 37-42.

Suzuki López, A. (1990). *Aislamiento, caracterización y seleccion de bacterias lácticas para la conservacion de pulpa de cafe por ensilaje* [Tesis de maestría, Univesidad Autonoma Metropolitana]. Casa abierta al tiempo.

Torres Valenzuela, L., Martínez , K., Serna Jimenez, J. y Hernández, M. (2019). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. *Información Tecnológica*, 30(2), 189-200. 10.4067/S0718-07642019000200189

Universidad de la República, Departamento de Bacterología y Virología. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología*. Oficina del libro FEFMUR.

Urquijo Trujillo, E. (2016). Identificación de impactos ambientales relacionados con el proceso de beneficio húmedo del café en la vereda Tres Esquinas-Huila-Colombia. *Universidad Militar Nueva Granada*. <http://hdl.handle.net/10654/15205>

Valencia, N., Sanz, J., Oliveros, C. y Ramírez, C. (2015). *Beneficio del café en Colombia: Prácticas y estrategias para el ahorro, uso eficiente del agua y el*

*control de la contaminación hídrica en el proceso de beneficio húmedo del café.* FNC y Cenicafé.

Valencia, N. y Zambrano, F. (2010). *Los subproductos del café: fuente de energía renovable.* Cenicafé.

Vuan Lanusse, M. (2018). *Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables* [Tesis de pregrado, Universidad ORT Uruguay]. <https://bibliotecas.ort.edu.uy/bibid/87410>

Waldir, E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E. y Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista peru biol.*, 14(2), 271-275.

Yarumo. (9 de Agosto de 2016). *La pulpa del café representa cerca del 44% del peso fresco del fruto.* Agronegocios. <https://www.agronegocios.co/aprenda/la-pulpa-del-cafe-2622103>